



Conception de biocapteurs à ADN photoélectrochimiques et impédancemétriques à base de polymères électrogénérés

Fatima Haddache

► To cite this version:

Fatima Haddache. Conception de biocapteurs à ADN photoélectrochimiques et impédancemétriques à base de polymères électrogénérés. Autre. Université Grenoble Alpes, 2015. Français. NNT : 2015GREAI106 . tel-01288203

HAL Id: tel-01288203

<https://theses.hal.science/tel-01288203>

Submitted on 14 Mar 2016

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

THÈSE

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ GRENOBLE ALPES

Spécialité : **Matériaux, Mécanique, Génie Civil, Électrochimie**

Arrêté ministériel : 7 août 2006

Présentée par

Fatima HADDACHE

Thèse dirigée par **Dr Alan Le Goff** et **Dr Chantal Gondran**
Et co-encadré par **Dr Karine Gorgy**

préparée au sein du **laboratoire Biosystèmes Électrochimiques
et Analytiques du Département de Chimie Moléculaire**
dans l'**École Doctorale I-MEP 2**

Conception de biocapteurs à ADN photoélectrochimiques et impédancemétriques à base de polymères électrogénérés

Thèse soutenue publiquement le « **8 décembre 2015** »,
devant le jury composé de :

M, Loïc BLUM

Professeur, Lyon

M, Serge COSNIER

Directeur de recherche CNRS, Grenoble

Mme, Chantal GONDRA

Maître de Conférences, Grenoble

Mme, Karine GORGY

Maître de Conférences, Grenoble

M, Alan LE GOFF

Chargé de recherche CNRS, Grenoble

M, Hubert PERROT

Directeur de recherche CNRS, Grenoble



INTRODUCTION GÉNÉRALE	1
ÉTUDES BIBLIOGRAPHIQUES	3
I. INTRODUCTION.....	4
1. Définition d'un biocapteur	4
2. Nature des biorécepteurs.....	5
3. Méthodes d'immobilisation des biorécepteurs	7
II. ADN ET BIORÉCEPTEURS	14
4. L'ADN	14
5. Les aptamères.....	18
6. Les protéines interagissant avec l'ADN	21
III. BIOCAPTEURS ÉLECTROCHIMIQUES À ADN À BASE DE POLYMÈRES ÉLECTROGÉNÉRÉS	22
7. Les polymères électrogénérés	22
8. Généralités	24
9. Les biocapteurs à ADN	25
IV. BIBLIOGRAPHIE.....	28
ÉTUDE DE L'INTERACTION D'UN ADN DOUBLE-BRIN AVEC UNE SURFACE MODIFIÉE PAR UNE PROTÉINE DE RÉPARATION: LA FPG (FORMAMIDOPYRIMIDINE ADN GLYCOSYLASE) DE DEINOCOCCUS RADIODURANS	32
I. GÉNÉRALITÉS	34
10. Dommages causés à l'ADN	34
11. Une protéine de réparation de l'ADN : la Formamidopyrimidine ADN Glycosylase (Fpg) de <i>Deinococcus radiodurans</i>	37
12. Contexte de l'étude	40
13. Techniques utilisées.....	41
II. CARACTÉRISATION DU PYRROLE-NTA ET DU POLY-(PYRROLE-NTA)	53
14. Electrochimie du monomère en solution.....	53
15. Électropolymérisation du pyrrole-NTA.....	54
16. Évaluation de la polymérisation du poly(pyrrole-NTA)	56
17. Impédance du film de poly(pyrrole-NTA)	58
III. ÉTUDE DE L'INTERACTION DE LA PROTÉINE FPG AVEC UN DOUBLE-BRIN D'ADN SANS LÉSION PAR DES MÉTHODES ÉLECTROCHIMIQUES	61
18. Les différentes étapes d'élaboration du biocapteur.....	61
19. Immobilisation des deux protéines Nt-His-Fpg et Fpg-His-Ct sur le poly(pyrrole NTA)	62
20. Interaction des protéines avec le duplex d'ADN sans lésion.....	72
21. Élaboration du biocapteur pour la détection de l'ADN par la protéine Fpg-His-Ct	78
IV. ÉTUDE DE L'INTERACTION DE LA PROTÉINE FPG AVEC UN DOUBLE-BRIN D'ADN AVEC LÉSIONS.....	83
V. CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES	86

VI.	BIBLIOGRAPHIE.....	87
VII.	EXPERIMENTAL PART.....	89
DÉTECTION PHOTOÉLECTROCHIMIQUE DE MOLÉCULE D'INTÉRÊT PAR INTERCALATION D'OLIGONUCLÉOTIDES SUR UNE ÉLECTRODE FONCTIONNALISÉE AVEC UN POLYMÈRE DE [RU(BPY-PYRROLE)₂(DPPN)]²⁺		94
I.	GÉNÉRALITÉS	97
22.	<i>Biocapteurs photoélectrochimiques à ADN.....</i>	<i>97</i>
23.	<i>Biocapteurs à ADN à base de métallointercalants.....</i>	<i>100</i>
24.	<i>Propriétés photoélectrochimiques des complexes trisbipyridines de ruthénium(II).....</i>	<i>101</i>
II.	ÉLECTRODES MODIFIÉES PAR UN FILM DE POLY- [RU(BPY-PYRROLE) ₂ (DPNN)] ²⁺	106
1.	<i>Synthèse du complexe [Ru(bpy-pyrrole)₂(dpnn)](PF₆)₂.....</i>	<i>106</i>
2.	<i>Électrochimie du monomère en solution.....</i>	<i>108</i>
3.	<i>Électropolymérisation du [Ru(bpy-pyrrole)₂(dpnn)]²⁺</i>	<i>109</i>
III.	CARACTÉRISATION PHOTOÉLECTROCHIMIQUE DU FILM DE POLY-([RU(BPY-PYRROLE) ₂ (DPNN)] ²⁺).....	113
1.	<i>Influence de la distance électrode – fibre optique</i>	<i>113</i>
2.	<i>Influence de la concentration du donneur sacrificiel sur la réponse photoélectrochimique du polymère.....</i>	<i>114</i>
3.	<i>Donneur ou accepteur sacrificiel ?</i>	<i>115</i>
4.	<i>Influence de l'épaisseur du polymère sur le signal photoélectrochimique du polymère</i>	<i>116</i>
IV.	ÉLABORATION D'UN PHOTOBIOCAPTEUR POUR LA DÉTECTION D'UNE SÉQUENCE SPÉCIFIQUE DU VIH	119
1.	<i>Preuve de concept.....</i>	<i>120</i>
2.	<i>Courbe d'étalonnage de la détection d'ADN du VIH</i>	<i>124</i>
3.	<i>Comparaison des deux courbes d'étalonnage obtenues.....</i>	<i>128</i>
4.	<i>Conclusion</i>	<i>133</i>
V.	ÉLABORATION D'UN PHOTOBIOCAPTEUR POUR LA DÉTECTION DE LA COCAÏNE PAR IMMOBILISATION D'UN APTAMÈRE	134
1.	<i>Aptacapteurs électrochimiques de la cocaïne.....</i>	<i>134</i>
2.	<i>Description et synthèse des aptamères.....</i>	<i>136</i>
3.	<i>Preuve de concept.....</i>	<i>140</i>
4.	<i>Courbe d'étalonnage de la détection de cocaïne</i>	<i>149</i>
5.	<i>Comparaison des deux courbes d'étalonnage obtenues.....</i>	<i>153</i>
6.	<i>Conclusion</i>	<i>158</i>
VI.	CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES	158
VII.	BIBLIOGRAPHIE	160
VIII.	EXPERIMENTAL PART.....	163
CONCLUSION GÉNÉRALE		169

Introduction générale

Depuis 1962, date de création du premier biocapteur, ces outils d'analyse ont connu un développement important. Ces dispositifs trouvent leurs applications dans de nombreux domaines tels que la santé, l'environnement, l'industrie agro-alimentaire, la défense ...

Les biocapteurs combinent les propriétés des macromolécules biologiques (ADN, protéines, oligosaccharides...) avec celles des matériaux permettant ainsi d'imaginer des architectures innovantes. L'immobilisation des macromolécules biologiques sur ces matériaux est une étape clé de la conception du biocapteur puisque cette étape conditionne les performances du biocapteur. Les polymères électrogénérés sont souvent utilisés comme matériau pour immobiliser les macromolécules biologiques.

Les polymères électrogénérés notamment le poly-pyrrole possèdent plusieurs propriétés intéressantes. En effet, il est possible de contrôler, par électrochimie, le dépôt de polymère à la surface de l'électrode, que ce soit en termes d'épaisseur, d'électro-addressage ou de morphologie du polymère. De plus, ils peuvent être fonctionnalisés à façon afin de greffer des groupements (biotine, adamantane, ...) intervenant dans l'immobilisation des biomolécules.

Les biocapteurs à ADN ont, depuis une vingtaine d'année, démontré une grande richesse dans les possibilités de détection de molécules dans de nombreux domaines. Grâce aux propriétés de reconnaissance de l'ADN, que ce soit dans des phénomènes d'hybridation d'ADN impliqués dans de nombreux processus biologiques ou dans leurs propriétés d'interactions avec de nombreux types de protéines, les biocapteurs à ADN représentent une classe de biocapteurs de plus en plus riche et flexible. Plus récemment, le développement grandissant d'une librairie d'oligonucléotides artificiels, les aptamères, capables de reconnaître spécifiquement de nombreux types de molécules (protéines, petites molécules organiques, etc...) a induit la conception d'aptacapteurs potentiellement spécifique de tout type de molécule ciblée. En parallèle, du fait de la flexibilité des plateformes de synthèse et de modification de l'ADN, la conception des biopuces à ADN a pour objectif de fournir des biocapteurs multi-analytes performants.

Afin de mieux positionner ce sujet de thèse, le premier chapitre est consacré à la bibliographie. Ce chapitre définit ce qu'est un biocapteur, développe les méthodes d'immobilisation de biomolécules sur surface et s'attarde sur le développement des biocapteurs électrochimiques à ADN à base de polymères électrogénérés.

Le second chapitre présente un biocapteur impédancemétrique à ADN élaboré à partir d'un poly-pyrrole fonctionnalisé avec un acide NitriloTriAcétique (NTA). Dans un premier temps, les propriétés et la caractérisation électrochimique de ce polymère sont présentés. Dans une seconde partie, l'immobilisation d'une protéine de réparation de l'ADN : la Formamidopyrimidine ADN Glycosylase (Fpg) de *Deinococcus radiodurans* sur ce polymère via un système d'affinité NTA / Cu^{2+} / Histidine est abordée. Et pour finir, la détection de duplex d'ADN par cette protéine immobilisée est réalisée par spectroscopie d'impédance électrochimique. Nous nous sommes également intéressées à la détection de duplex d'ADN portant une lésion : la 8-oxo-guanine. L'accumulation de cette lésion dans l'organisme est un marqueur biologique pour la détection de cancer.

Le dernier chapitre est consacré à l'élaboration d'un capteur photoélectrochimique à base d'un centre polypyridinique de ruthénium possédant des propriétés photosensibles. Ce complexe de ruthénium porte deux groupements pyrrole, utilisé pour former un film de polymère à la surface d'une électrode et un ligand dppn connu pour intercaler les oligonucléotides. Ainsi, dans un premier temps, un biocapteur pour la détection de l'ADN du Virus de l'Immunodéficience Humaine (VIH) a été élaboré. Ce biocapteur a permis de démontrer que le ligand dppn pouvait être utilisé pour immobiliser des oligonucléotides. C'est pourquoi, dans un second temps, un aptacapteur photoélectrochimique pour la détection de cocaïne à l'aide d'un aptamère est réalisé.

Études bibliographiques

ÉTUDES BIBLIOGRAPHIQUES	3
I. INTRODUCTION.....	4
1. <i>Définition d'un biocapteur</i>	4
2. <i>Nature des biorécepteurs</i>	5
a. Les biocapteurs catalytiques	5
b. Biocapteurs d'affinité.....	6
3. <i>Méthodes d'immobilisation des biorécepteurs</i>	7
a. L'adsorption	8
b. La réticulation	8
c. L'inclusion dans une matrice.....	10
d. Les assemblages supramoléculaires	10
e. Immobilisation covalente.....	12
II. ADN ET BIORÉCEPTEURS	14
1. <i>L'ADN</i>	14
a. Les composants de l'ADN.....	14
b. Propriétés de la double hélice d'ADN	16
2. <i>Les aptamères</i>	18
a. Composants et structure des aptamères.....	18
b. Propriétés des aptamères	20
3. <i>Les protéines interagissant avec l'ADN</i>	21
a. Liaison ADN - Protéine	21
b. Les enzymes modifiant la structure en double hélice de l'ADN	22
III. BIOCAPTEURS ÉLECTROCHIMIQUES À ADN À BASE DE POLYMÈRES ÉLECTROGÉNÉRÉS	22
1. <i>Les polymères électrogénérés</i>	22
2. <i>Généralités</i>	24
3. <i>Les biocapteurs à ADN</i>	25
IV. BIBLIOGRAPHIE.....	28

I. Introduction

Les biocapteurs sont des dispositifs permettant de détecter une multitude de molécules. Ainsi, on les retrouve dans les domaines de la santé, l'agro-alimentaire, la protection de l'environnement, la prévention contre le bioterrorisme^[1]. Ces différents secteurs requièrent de nouvelles techniques de détection rapide et peu coûteuse. C'est pourquoi, ces dispositifs font l'objet de nombreuses recherches.

1. Définition d'un biocapteur

Un biocapteur est composé de deux éléments essentiels étroitement associés : un élément biologique sensible appelé biorécepteur et un transducteur (Figure 1).

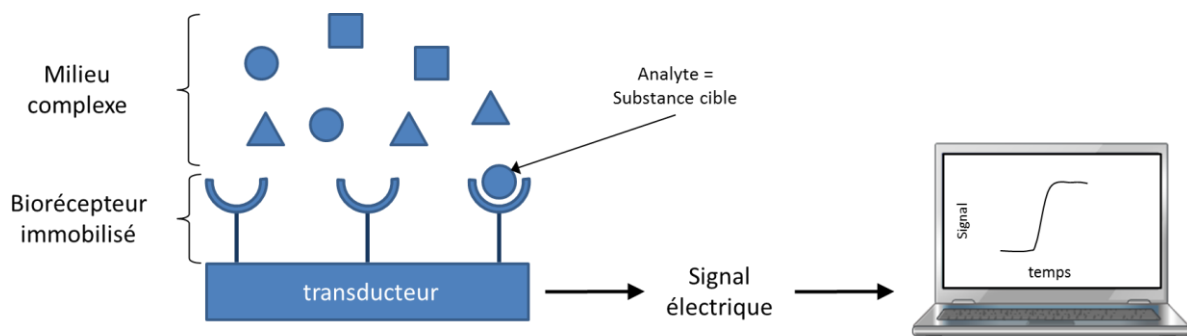


Figure 1. Schéma illustrant le principe de fonctionnement d'un biocapteur

Le biorécepteur (anticorps, enzyme, ADN...) immobilisé à la surface du transducteur, reconnaît une substance cible (antigène, substrat, ADN complémentaire...) dans un milieu complexe. Le transducteur traduit les modifications physico-chimiques (émission de photons, variation de pH, de masse...) issues de la reconnaissance entre le biorécepteur et la molécule cible en un signal électrique mesurable qui sera transmis à un système d'analyse de données après avoir éventuellement subi une amplification. Ce signal électrique est corrélable à la concentration en substance cible dans le milieu.

Un biocapteur est défini par plusieurs caractéristiques^[2] :

- La sélectivité : le biocapteur se doit de reconnaître uniquement l'analyte d'intérêt. Cela est d'autant plus vrai lorsque l'analyte se trouve dans un milieu complexe (plasma sanguin, eaux, ...) contenant plusieurs molécules différentes.

- La limite de détection : cette valeur correspond à la concentration minimale réelle qui peut être détecté par le biocapteur. Elle doit être trois fois plus importante que le bruit généré par le système.
- Le domaine de linéarité : La détermination du domaine de linéarité offre la possibilité de doser l'analyte en question se trouvant dans un échantillon inconnu. Le domaine de linéarité est obtenu après le tracé d'une courbe d'étalonnage (ajout de concentrations croissantes d'analyte). En général, le domaine de linéarité est compris entre la valeur de la limite de détection et la valeur où la sonde est saturée par la cible.
- La sensibilité : Cette valeur correspond à la pente obtenue dans le domaine de linéarité du capteur. Elle correspond à la variation du signal mesuré par unité de concentration de l'analyte.
- Le temps de réponse : c'est le temps nécessaire pour obtenir une réponse du biocapteur. Pour être attrayant, un biocapteur doit pouvoir réaliser une mesure en temps réel.

2. Nature des biorécepteurs

Le biorécepteur immobilisé, constituant la couche sensible du biocapteur est de nature diverse selon le type de molécules à détecter. En théorie, toute structure biochimique ou biologique capable de reconnaissance spécifique est potentiellement utilisable pour l'élaboration de la couche sensible. Selon le type de biorécepteurs utilisés, les biocapteurs peuvent être classés en deux catégories : les biocapteurs catalytiques et les biocapteurs d'affinité, qui sont détaillées ci-après.

a. Les biocapteurs catalytiques

Historiquement, c'est essentiellement à partir de structures protéiques telles que les enzymes et les anticorps qu'ont été élaborés les premiers biocapteurs. Par la suite, les acides nucléiques et certains micro-organismes ont aussi joué le rôle d'éléments sensibles. Les enzymes représentent la catégorie de biorécepteurs la plus utilisée. Elles possèdent une activité catalytique. Au cours de la réaction catalysée par une enzyme, les substrats se lient transitoirement à cette molécule et forment un complexe. Le substrat est alors transformé en produit qui se détache de l'enzyme. Cette dernière reprend sa forme initiale et se retrouve intacte. Elle peut ainsi engager un nouveau cycle catalytique. Une enzyme ne

catalyse qu'un seul type de réaction (oxydation, hydrolyse, ...) et limite, le plus souvent, son action à un seul substrat. Le principe d'utilisation des enzymes dans les biocapteurs de première génération est illustré Figure 2.

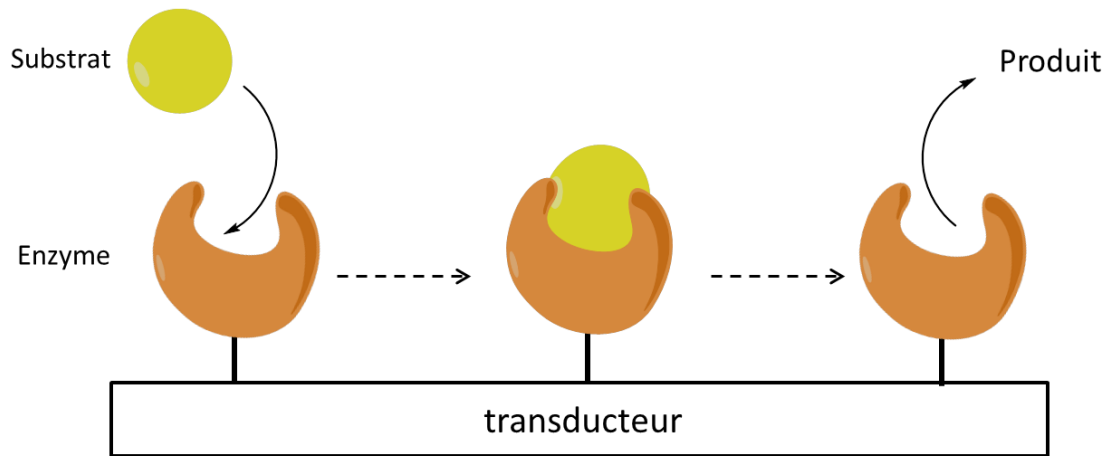


Figure 2. Principe de fonctionnement d'un biocapteur enzymatique de première génération

Certains micro-organismes peuvent également être utilisés^[3]. Ils métabolisent un composé particulier, ce qui entraîne la production et l'excrétion d'une substance détectable par un système de transduction. Toutefois, les biocapteurs à base de cellules microbiennes présentent un manque de sélectivité et un temps de réponse généralement long par rapport à un biocapteur à enzymes dû à l'existence de plusieurs systèmes enzymatiques au sein de chaque cellule.

Des anticorps catalytiques, également appelés abzymes,^[4] peuvent aussi être utilisés comme biorécepteur artificiel. La principale approche pour obtenir ces molécules consiste à produire des anticorps dirigés contre un composé analogue de l'état de transition d'une réaction donnée. Parmi les différents anticorps obtenus, certains ont à la fois la capacité de reconnaissance spécifique des anticorps et une activité catalytique permettant de transformer la substance cible (l'antigène) par un processus similaire à celui de la réaction enzymatique.

b. Biocapteurs d'affinité

Les biocapteurs d'affinité^[5] utilisent des biomolécules sélectives capables de réaliser des liaisons spécifiques (anticorps, récepteurs membranaires ou des oligonucléotides) avec l'analyte cible pour produire un signal électrique mesurable. La reconnaissance moléculaire est principalement déterminée par des complémentarités de taille et de forme du site de

liaison pour l'analyte d'intérêt. La grande affinité et la spécificité de ces biomolécules pour leurs ligands en font des outils très sensibles et très sélectifs. Les biorécepteurs dits « naturels » que l'on trouve dans cette catégorie sont les anticorps et l'ADN.

Les anticorps sont des protéines spécialisées qui reconnaissent spécifiquement un antigène, c'est-à-dire une molécule étrangère à l'organisme, formant ainsi par affinité un complexe antigène-anticorps.^[6]

L'ADN, support de l'information génétique, est constitué de deux brins d'acides nucléiques complémentaires enroulés en double hélice. Le principe de fonctionnement des biocapteurs à ADN est fondé sur le phénomène d'hybridation entre des séquences complémentaires de brins d'acides nucléiques. Les brins d'ADN sonde immobilisés sur une surface vont s'associer spécifiquement à des brins d'ADN cibles complémentaires présents dans un échantillon.^[7-10]

Il existe également des biorécepteurs de synthèse tels que les récepteurs artificiels^[11] ou les aptamères.^[12] Les récepteurs artificiels sont des composés organiques obtenus par la synthèse afin que leur structure comporte un site complémentaire à la substance cible.

La Figure 3 illustre l'immobilisation de certains biorécepteurs utilisés dans les biocapteurs d'affinité.

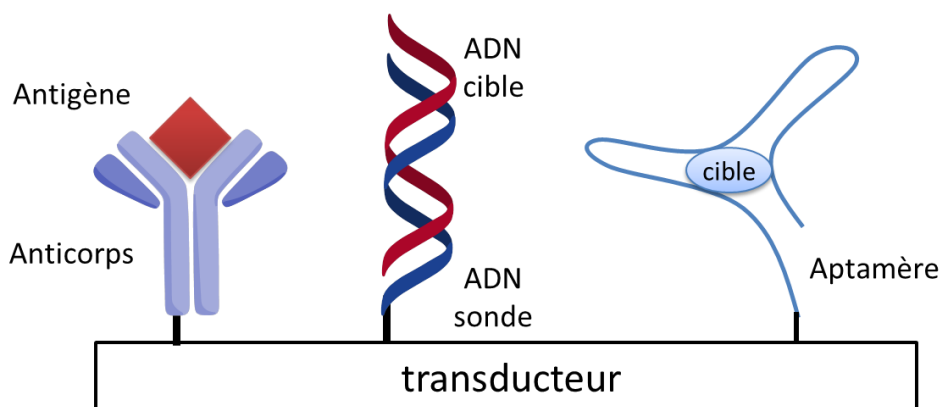


Figure 3. Représentation schématique de différents biocapteurs d'affinité : système antigène-anticorps, ADN sonde – ADN cible et aptamère – molécule cible.

3. Méthodes d'immobilisation des biorécepteurs

L'immobilisation de l'élément biologique est une étape clé dans la réalisation d'un biocapteur. Ce procédé doit permettre de conserver les propriétés de reconnaissance du biorécepteur et de catalyse, dans le cas d'enzyme, tout en conservant son accessibilité. Dans

le cas de biocapteurs électrochimiques, le support d'immobilisation est généralement une surface d'électrode qui opérera la transduction du signal de reconnaissance entre le biorécepteur et l'analyte en signal électrique. Une électrode fonctionnalisée avec une biomolécule est appelé bioélectrode. Les méthodes d'immobilisation, qui ne doivent pas réduire l'activité et la spécificité du biorécepteur (enzyme, ADN, anticorps...), peuvent être réalisées selon différents procédés tels que l'adsorption, l'encapsulation, la réticulation, les assemblages supramoléculaires ou encore la formation de liens covalents.^[13]

a. L'adsorption

L'adsorption, dont le principe est illustré Figure 4, est la méthode la plus simple pour fonctionnaliser une électrode ou un matériau d'électrode avec une monocouche de biorécepteur. L'immobilisation de celui-ci repose sur des interactions électrostatiques ou hydrophobes avec la surface de l'électrode. Les molécules non-absorbées sont ensuite éliminées par simple rinçage. Cette méthode présente l'avantage d'être facilement réalisable et ne génère en principe pas de gêne stérique, laissant ainsi l'analyte diffuser vers le biorécepteur. En revanche, la stabilité de ces dispositifs est sujette au phénomène de désorption du matériel biologique déposé, rendant celui-ci inutilisable après un certain temps. De plus, cette technique ne permet pas d'orienter le biorécepteur à la surface de l'électrode.

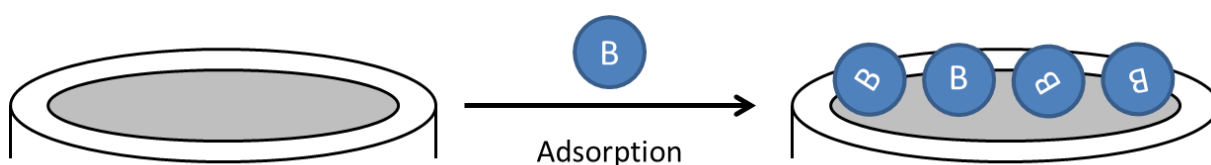
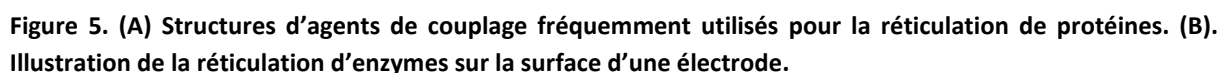


Figure 4. Illustration de la fonctionnalisation de la surface d'une électrode par simple adsorption du biorécepteur.

b. La réticulation

La réticulation de biomolécules, et plus particulièrement d'enzymes, est une technique qui a été initiée dans les années 60.^[14] Cette méthode consiste à faire réagir un résidu $-NH_2$ se trouvant à la surface de la protéine avec un agent de couplage bi-fonctionnel appelé également « cross-linker ».

La réaction entre la protéine et l'agent de couplage conduit à la formation d'un réseau d'enzyme réticulé, insoluble. Le gel étant fragile et difficilement manipulable, les enzymes sont dans un premier temps adsorbées ou encapsulées dans une matrice de polymère (comme le chitosane par exemple) à la surface d'une électrode puis l'agent de réticulation est ajouté (Figure 5B).^[17,18] Cette méthode présente l'avantage d'immobiliser de façon plus stable des protéines à la surface d'une électrode comparée à une simple adsorption. Par contre, une baisse de l'activité catalytique est observée avec cette méthode d'immobilisation car la formation de liaison avec l'agent de réticulation peut dénaturer les protéines ou diminuer l'activité et la spécificité des biomolécules. De plus, cette technique ne permet pas une immobilisation reproductible des biomolécules.



9

c. L'inclusion dans une matrice

Cette méthode consiste à capturer le biorécepteur, en général une protéine dans une matrice 3D. Cette matrice peut être un polymère comme le chitosan^[19], le nafion^[20] ou un polymère conducteur électrogénéré^[13] tels que le poly-pyrrole, le poly-thiophène ou le poly-aniline, plus amplement décrits dans la section III.

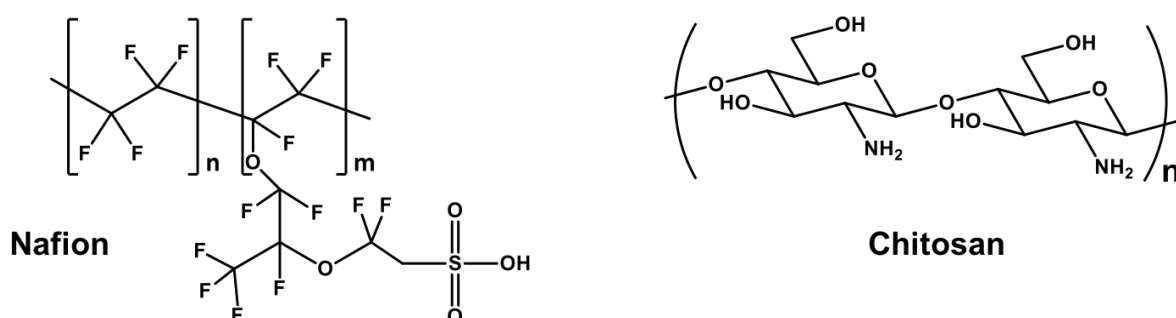


Figure 6. Structures de polymères utilisés pour l'encapsulation de biomolécules à la surface d'une électrode

Aucune réaction chimique n'a lieu entre la biomolécule et le polymère, donc cette méthode ne dénature pas l'enzyme. Un film de polymère peut immobiliser différents types de biomolécules ainsi qu'une quantité d'élévée de biomolécules. Par contre, la présence du polymère génère une barrière de diffusion, ce qui peut augmenter le temps de réponse dans le cas d'un biocapteur.

D'autres techniques d'inclusion de biomolécules dans une matrice existent telles que l'inclusion dans une matrice amphiphile de PDMS (polydiméthyle siloxane),^[21] de photopolymère,^[22] des gels de silice,^[23] des polysaccharides,^[24] des pâtes de carbone^[25] ou des matrices inorganiques biocompatibles^[26] (couches double hydroxy lamellaires, nanoparticules de carbonate de calcium, etc).

d. Les assemblages supramoléculaires

Cette technique consiste à utiliser l'affinité que certaines molécules ont entre elles afin de les immobiliser sur une électrode.

Il existe différents systèmes. Le système (strept)avidine / biotine^[27] est l'un des systèmes d'affinité les plus connus. La (strept)avidine est capable de fixer quatre biotines (Figure 7A) et possède une constante d'association élevée de l'ordre de 10^{15} L.mol⁻¹.

Le système adamantane / cyclodextrine^[1] est également utilisé pour réaliser des assemblages supramoléculaires et possède une constante d'association de l'ordre de 10^5 L.mol⁻¹. Les cyclodextrines permettent une forte reconnaissance avec certains types de substrats en s'insérant à l'intérieur de leur cavité hydrophobe. De nombreuses publications décrivent notamment l'interaction entre des dérivés ferrocène^[28] et adamantane^[1,29,30] (Figure 7B) avec les cyclodextrines.

Une autre méthode consiste en la formation d'un complexe de coordination autour d'un cation cuivre ou nickel avec un résidu nitrilotriacétique (NTA). Ce complexe de coordination est capable d'immobiliser des biomolécules fonctionnalisées avec une étiquette tag histine ou biotine (Figure 7C).^[7,31,32]

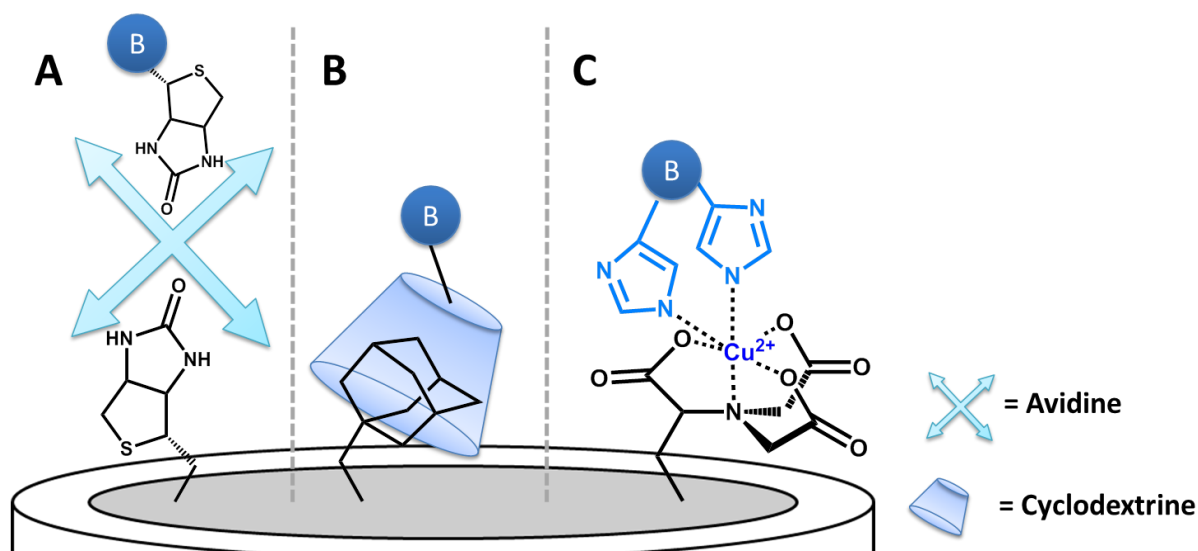


Figure 7. Électrode fonctionnalisée avec un biorécepteur immobilisé *via* des interactions supramoléculaires (A) Dépôt couche par couche biotine/avidine/biomolécule portant une étiquette tag biotine (B) interaction adamantane/biomolécule portant une étiquette tag cyclodextrine et (C) Complexe nitrilotriacétique (NTA)/Cu²⁺/biomolécule portant une étiquette tag histidine.

Ces techniques sont parmi les plus développées mais il en existe beaucoup d'autres se basant par exemple sur les interactions électrostatiques ou encore hydrophobes^[33],

L'introduction du groupement fonctionnel à la surface de l'électrode peut être réalisé par des techniques électrochimiques en utilisant des groupements pyrrole modifiés par des biotines^[34,35], des groupements NTA^[31] ou des groupements adamantane^[29]; en utilisant l'électrogreffage de composés aryldiazoniums^[36] ou en utilisant des monocouches auto-assemblées (self assembled monolayer ou SAM).^[37-39]

Ces interactions présentent toutes l'avantage d'être spécifiques et de s'effectuer dans des conditions douces, n'altérant donc pas les propriétés du matériel biologique mais nécessite parfois la fonctionnalisation des biomolécules avec une étiquette histidine, biotine, adamantane, etc...

e. Immobilisation covalente

L'immobilisation covalente d'une biomolécule consiste à former une liaison covalente entre la biomolécule et la surface de l'électrode. Pour cela, la liaison covalente est formée à partir d'un groupement fonctionnel de l'enzyme, qui n'est pas impliqué dans l'activité catalytique de celle-ci, et une surface préalablement activée.^[40]

Dans la littérature, on trouve un grand nombre d'articles décrivant l'utilisation de certains acides aminés, présents à la surface des protéines, pouvant former une liaison covalente avec une surface active.^[13,41] Donc cette technique ne demande aucune modification de la biomolécule au préalable, puisque cette technique repose sur les groupements déjà présents dans la protéine.

Une des méthodes de ligation les plus largement utilisées fait intervenir la réactivité du groupement $-NH_2$ des résidus lysine sur des fonctions N-hydroxysuccinimide (NHS) ester activé donnant lieu à la formation d'un amide (Figure 8). Les lysines peuvent également réagir avec des aldéhydes pour former une amine.

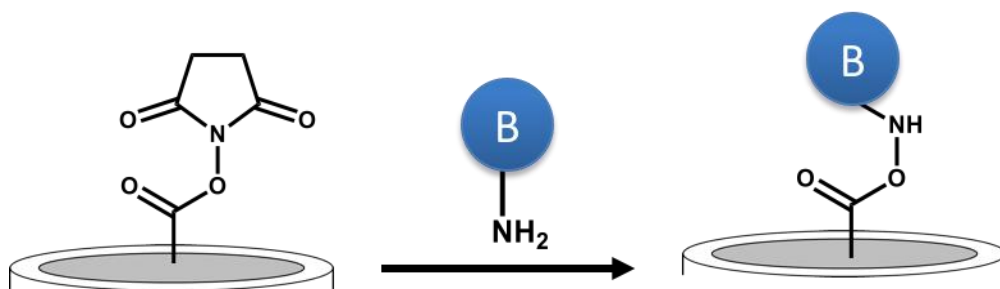


Figure 8. Principe simplifié d'immobilisation covalente sur la surface d'une électrode *via* la formation d'un lien amide à partir de la réaction d'un ester activé N-Hydroxysuccinimide (NHS) et d'un groupement amine de la biomolécule

La fonction thiol ($-SH$) des résidus cystéines peut également réagir soit avec une autre fonction thiol soit avec des groupements maléimide se trouvant sur la surface de l'électrode pour immobiliser des protéines (Figure 9).

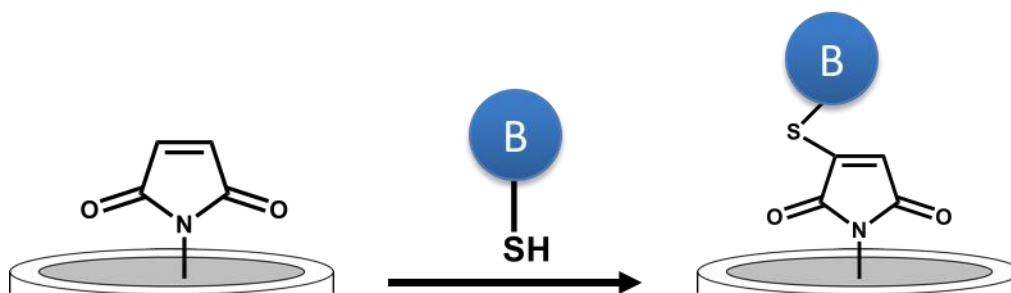


Figure 9. Principe simplifié d'immobilisation covalente sur la surface d'une électrode d'une biomolécule suite à la réaction d'un résidu cystéine avec un groupement maléimide pour former une liaison thioéther.

Les groupements $-SH$ des résidus cystéines et $-NH_2$ des résidus lysines peuvent également réagir avec les surfaces d'électrodes fonctionnalisées avec des époxy (Figure 10).

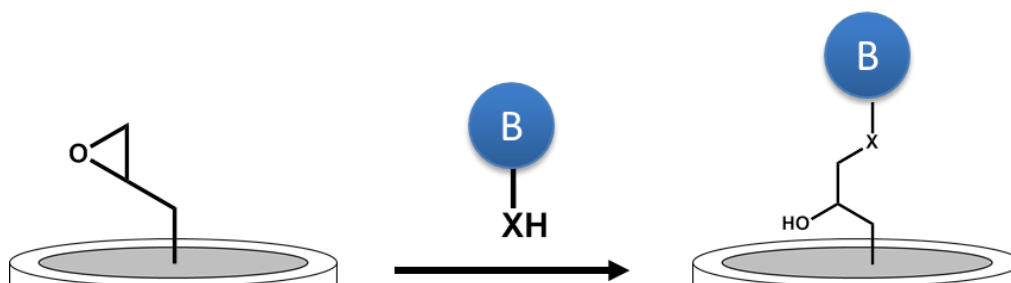


Figure 10. Principe simplifiée d'immobilisation covalente sur la surface d'une électrode suite à la réaction d'un résidu nucléophile sur l'entité biologique avec un groupement époxy sur surface ($X = NH$ d'une lysine ou S d'une cystéine).

Il est possible de modifier les biomolécules afin d'inclure des groupements chimiques spécifiques. Les ligations chimiosélectives les plus utilisées pour greffer des entités biologiques sur surface sont, entre autre : la cyclo addition 1,3-dipolaire de Huisgen (Figure 11A), la ligation de Staudinger ainsi que la cyclo addition de Diels-Alder (Figure 11Figure 10B)^[41–43].

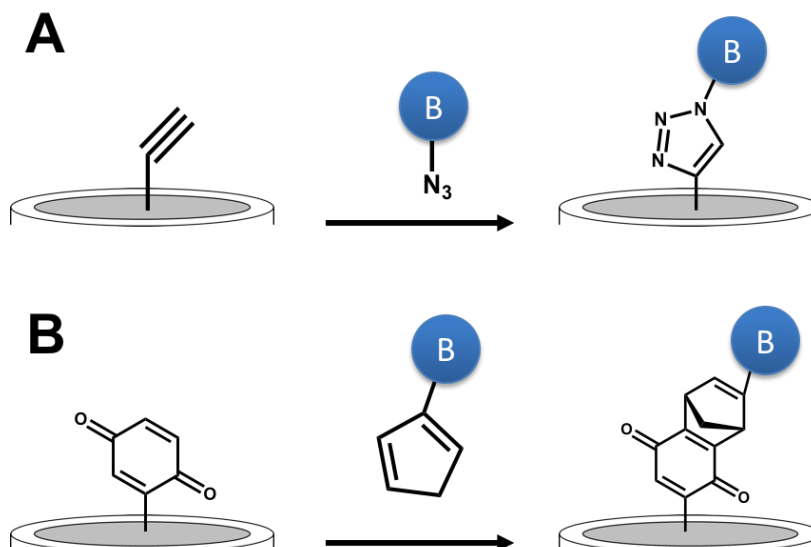


Figure 11. Principe simplifiée d'immobilisation covalente sur surface d'électrode suite à (A) une réaction de cycloaddition de Huisgen catalysée au cuivre entre un alcyne immobilisé et une biomolécule modifiée avec un groupement azido et (B) réaction de Diels-Alder entre une surface portant un accepteur et une biomolécule portant un donneur.

L'immobilisation de biomolécules sur des électrodes *via* une liaison covalente permet une immobilisation efficace et théoriquement irréversible de la biomolécule. Un autre avantage de cette technique est de ne pas former de barrière de diffusion. Par contre, une diminution de l'activité de l'enzyme peut être observée.

II. ADN et biorécepteurs

Dans la suite de ce chapitre, nous allons nous intéresser aux macromolécules suivantes : l'ADN, les aptamère et les protéines interagissant avec l'ADN. Dans cette partie, nous n'aborderons que les systèmes qui ont été utilisés dans le cadre de ce travail.

1. L'ADN

a. Les composants de l'ADN

L'Acide DésoxyriboNucléique (ADN) est universel. Cette molécule est le support de l'information génétique. Il a été isolé pour la première fois par Friedrich Miesher en 1869. Sa structure en double-hélice a été décrite en 1953 par James D. Watson, Francis H. Crick et Rosalind Elsie Franklin. L'ADN est un polymère de nucléotide. Chaque nucléotide, dont la structure est représentée Figure 12, est composé d'un groupement phosphate (en rouge),

d'un sucre : le désoxyribose (également appelé 2'-désoxy-β-D-ribose) (en noir) et d'une base azotée (en bleu). Chaque base est fixée sur un désoxyribose *via* une liaison N-glycosidique.

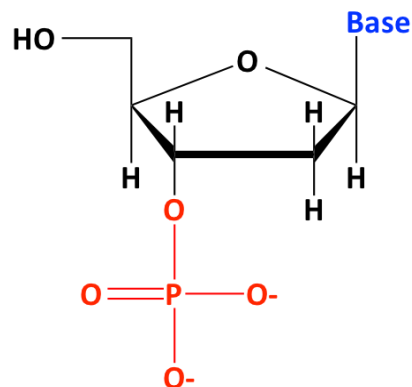


Figure 12. Structure d'un nucléotide

Il existe quatre types de bases qui rentrent dans la composition de l'ADN : l'adénine (notée A), la thymine (notée T), la cytosine (notée C) et la guanine (notée G). L'uracile (notée U) se retrouve uniquement dans l'ARN (Acide RiboNucléique). Ces bases sont classées en deux familles : les pyrimidines (T, C et U) et les purines (A et G). Les bases puriques sont complémentaires des bases pyrimidiques ainsi l'adénine s'apparie avec la thymine et la guanine avec la cytosine formant ainsi une paire de base. Les liaisons hydrogènes existant entre les bases complémentaires (2 liaisons hydrogènes entre l'adénine et la thymine et 3 liaisons hydrogènes entre la guanine et la cytosine) assurent la stabilité de la structure de l'ADN. La structure de ces bases azotées ainsi que leur appariement est présenté Figure 13.

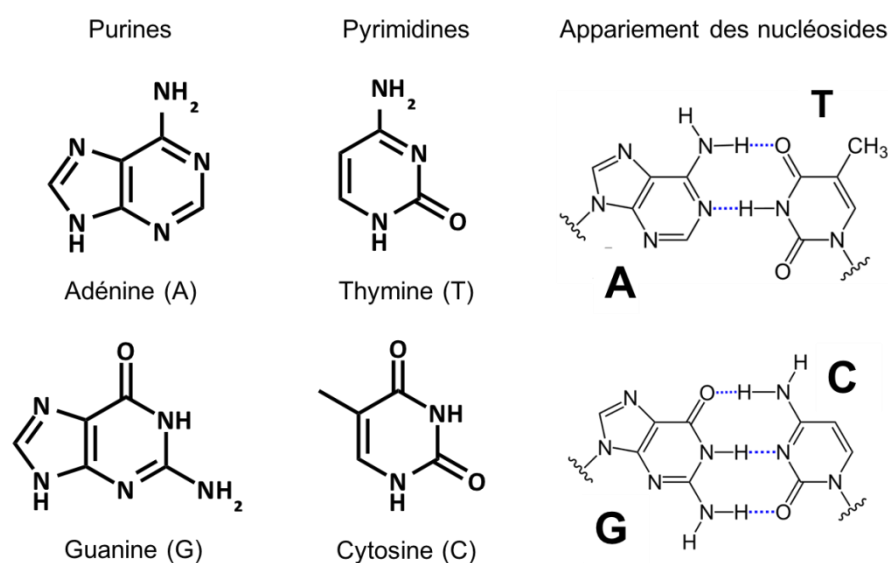


Figure 13. Structure des deux familles de nucléosides composant l'ADN ainsi que leur appariement dans l'ADN *via* des liaisons hydrogènes (---)

Dans l'ADN, les nucléotides sont reliés entre eux par une liaison 5'-3' phosphodiester (Figure 14) qui unit le carbone C5' d'une unité osidique au carbone C3' de la suivante (la notation 5' et 3' fait référence à la numérotation des sucres).

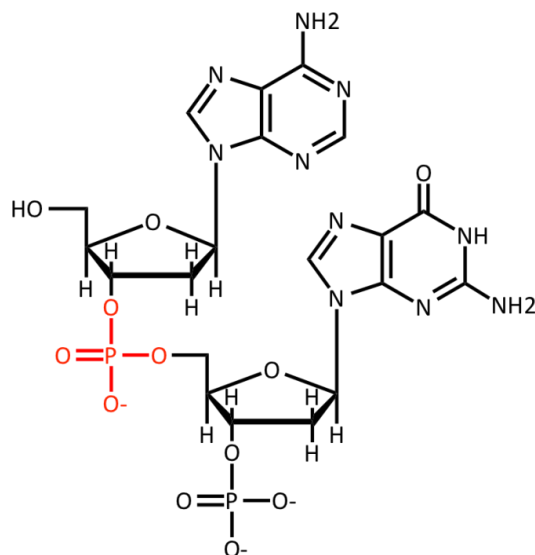


Figure 14. Liaison d'une adénosine et d'une guanosine *via* une liaison 5'-3' phosphodiester (en rouge) sur un ADN monocaténaire

b. Propriétés de la double hélice d'ADN

L'ADN est formé de deux brins d'ADN (appelé également ADN bicaténaire ou duplex d'ADN). Ces deux brins forment une double hélice dont les deux brins sont complémentaires et antiparallèles (l'extrémité 5' fait face à l'extrémité 3'). Il existe différentes conformations de la double hélice d'ADN ainsi on parlera d'ADN-A, ADN-B et ADN-Z.^[44]

L'ADN-A et l'ADN-B sont de conformation droite. Cela signifie que la double hélice tourne vers la droite si on la regarde de bas en haut. Le passage de la conformation ADN-B à ADN-A est réversible et est dépendante du taux d'humidité. Un taux d'humidité important favorise la conformation ADN-B.

La double-hélice d'ADN-Z est une conformation gauche et possède une structure irrégulière.

La conformation de la double-hélice d'ADN-B est la plus courante et par conséquent utilisée pour élaborer des biocapteurs à ADN. La structure de l'ADN-B est présentée Figure 15.

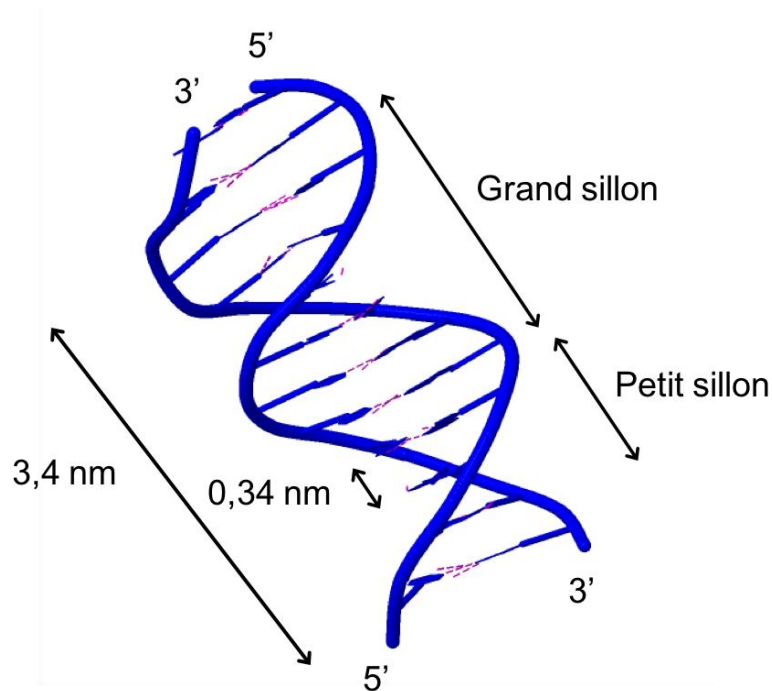


Figure 15. Conformation de la double-hélice de l'ADN-B (image PDB : 1BNA)

Cette double hélice est caractérisée par la présence des unités sucre-phosphate à l'extérieur et les bases azotées orientées à l'intérieur. Le diamètre de la double hélice est de 2 nm. La distance entre deux paires de bases est de 0,34 nm et le pas de l'hélice est de 3,4 nm soit 10 paires de bases par tour. Les squelettes ribose-phosphate respectifs des 2 brins d'ADN vont délimiter un grand et un petit sillon. La stabilité de cette double hélice d'ADN est assurée par les interactions entre les noyaux aromatiques (π -stacking).

Il est possible de dénaturer un ADN bicaténaire en le chauffant. La dénaturation de l'ADN consiste à séparer les deux brins complémentaires. Le chauffage va rompre les liaisons hydrogènes rendant ainsi la double hélice instable. La température à laquelle 50 % de l'ADN est dénaturée, est appelé température de fusion ou T_m (melting temperature). Il est possible de suivre en UV, la dénaturation de l'ADN.

En refroidissant, les brins d'ADN vont se réappairer, c'est-à-dire que les deux brins d'ADN qui sont complémentaires vont se ré-hybrider (Figure 16).

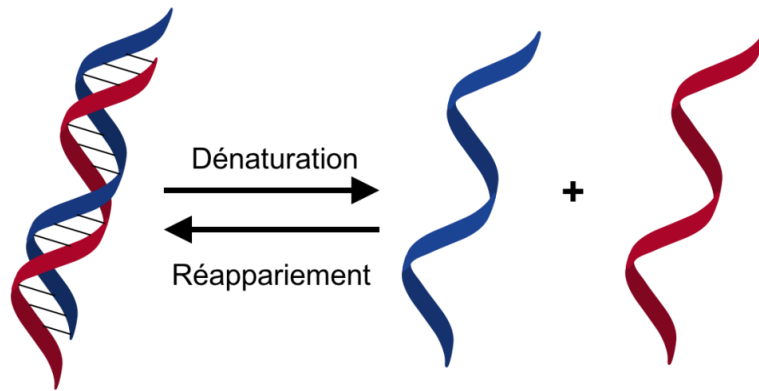


Figure 16. Principe de la dénaturation et du réappariement de l'ADN

Cette molécule peut subir des dommages qui peuvent mettre en péril la vie de la cellule. Ces modifications sont abordées dans le chapitre II.

2. Les aptamères

a. Composants et structure des aptamères

En 1990, les groupe de Szostak^[45], Gold^[46] et Joyce^[47], ont développé en parallèle une technique qui consiste à sélectionner *in vitro* des séquences d'acides nucléiques pouvant se lier de façon spécifique et avec une haute affinité à des molécules cibles qui ne sont pas des acides nucléiques. Ces séquences d'acides nucléiques sont appelées des aptamères. La technique par laquelle ils sont obtenus est appelé la méthode SELEX (Selection Evolution of Ligands by Exponential enrichment). Le principe de cette méthode est illustré Figure 17.

Cette méthode permet d'isoler un aptamère à partir d'une bibliothèque d'oligonucléotides et est composé de plusieurs étapes qui se répètent afin de sélectionner la séquence d'oligonucléotides présentant l'affinité la plus forte avec la cible. Cette technique commence par la synthèse d'une bibliothèque d'oligonucléotides comprenant un grand nombre de séquences aléatoires. Ensuite, ces séquences sont incubées avec la cible. Les séquences qui ne se sont pas liées à la cible seront éliminées et celles qui se sont liées à la cible seront extraites et amplifiées par PCR (Polymerase Chain Reaction) dans le but de créer une nouvelle bibliothèque pour le cycle suivant.

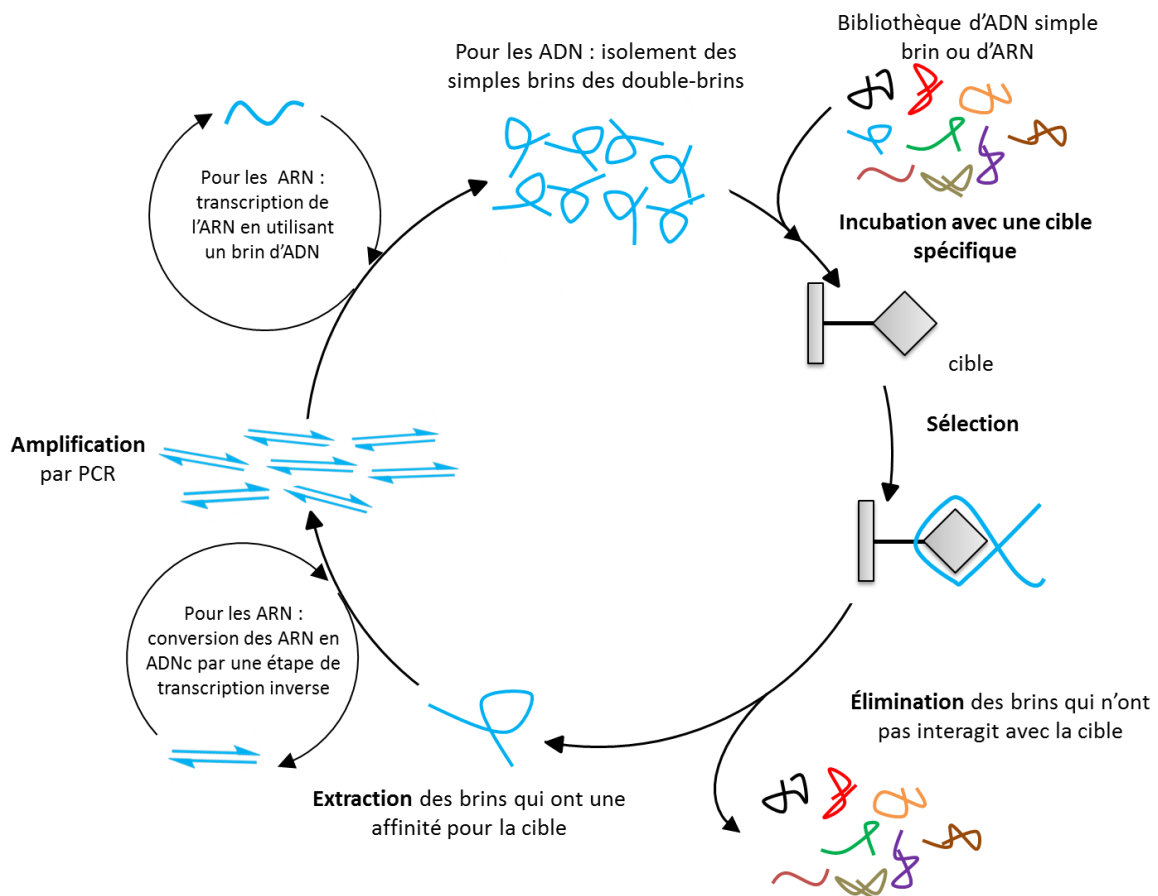


Figure 17. Principe de la méthode SELEX

Les aptamères sont des oligonucléotides synthétiques composés tout comme l'ADN ou l'ARN d'adénine, guanine, cytosine et de thymine ou d'uracile dans le cas d'un ARN. Ils sont formés uniquement par un seul brin composé de 20 à 150 nucléotides.^[48] Étant composés que d'un seul brin ; les aptamères se replient sur eux-mêmes en respectant les règles d'appariement des bases composant les duplex d'ADN dans le but de former une structure 3D stable. Dans la littérature, on trouve la description de différents motifs composants les aptamères. Il y a les motifs en « épingle à cheveux » ou « tige-boucle »^[49] qui correspondent à une double hélice d'ADN avec à l'extrémité une boucle de quelques nucléotides non appariés (généralement entre 4 et 8) (Figure 18A). Le second motif est la structure dite en pseudo-nœud^[50] qui résulte de l'appariement de nucléotides de la boucle avec des nucléotides présents dans une autre région du brin et située en dehors de la tige. Cette structure présente ainsi deux hélices (Figure 18B). Puis il y a la structure dite G-quadruplex^[51] qui résulte de l'empilement de plusieurs G-quartets (ou tétrades de guanines qui correspondent à l'association de 4 guanines dans un même plan cyclique). Chacune est un donneur et un accepteur de deux liaisons hydrogène. L'empilement d'au moins deux tétrades de guanine

délimite au centre une zone chargée négativement qui permet l'inclusion de cations qui permettent de stabiliser la structure. Le repliement en solution ainsi que les changements de conformation en présence de la molécule cible peuvent être ainsi fortement dépendants de la présence de cations divalents.^[52]

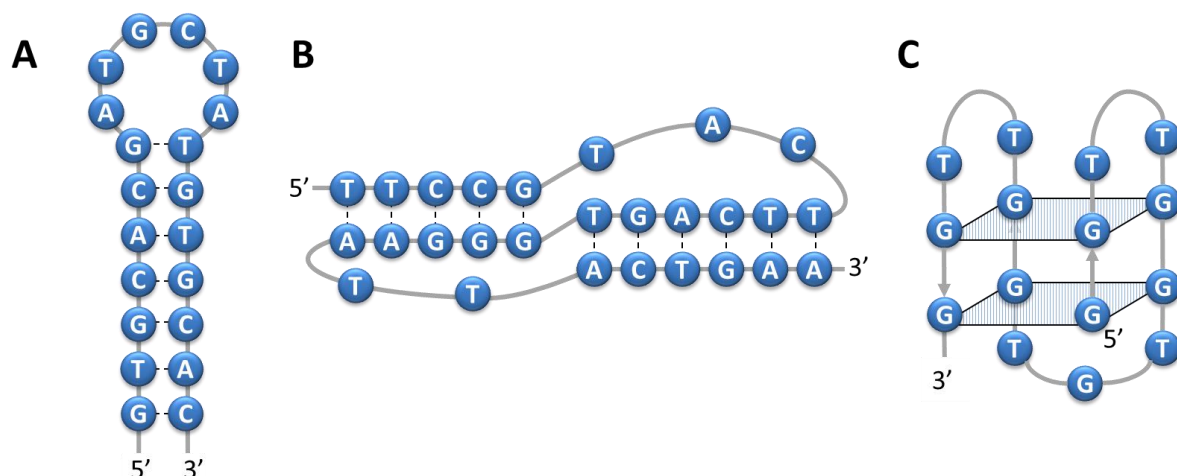


Figure 18. Représentation schématique des principaux motifs composant les aptamères (A). le motif « tige-boucle », (B). le motif pseudo-nœud et (C). le motif G-quartet (Adapté de la référence ^[53])

b. Propriétés des aptamères

Les aptamères ont connu un développement important durant ces vingt-cinq dernières années. Ces molécules ont la particularité de se lier spécifiquement à des molécules cibles avec une forte affinité et une forte spécificité, pouvant égaler celle des anticorps. Les cibles utilisées peuvent être des ions métalliques, des toxines, des acides aminés ou des peptides, des macromolécules comme des protéines, des polluants^[54] ou des microorganismes pathogènes.^[55] De par la diversité des cibles pouvant être détectées, les aptamères sont largement utilisés comme élément de reconnaissance et leur utilisation dans les biocapteurs a connu un essor considérable ces dernières années. Ils présentent en effet de nombreux avantages : ce sont des molécules de petite taille produites par synthèse chimique avec une grande stabilité chimique. Leur modification chimique est facile, permettant ainsi l'ajout d'un marquage avec une sonde fluorescente, ou par des nanoparticules par exemple, sans altérer leur affinité.^[56] De plus, ils peuvent subir plusieurs cycles de dénaturation et régénération, sans que cela n'affecte leurs propriétés.

3. Les protéines interagissant avec l'ADN

De nombreuses protéines sont capables d'interagir non-spécifiquement ou spécifiquement avec l'ADN. Les protéines possèdent un domaine capable d'interagir avec un ADN monobrin ou bicaténaire. Les fonctions de ces protéines sont fondamentales pour la survie de la cellule puisqu'elles interviennent dans la transcription, réplication, recombinaison et réparation.^[57]

Les biocapteurs à ADN élaborés avec des protéines sont soit conçus sur l'affinité protéine – ADN soit avec des enzymes modifiant la structure de la double hélice d'ADN permettant ainsi une détection directe *via* la mesure de leurs activités catalytiques dont quelques exemples sont cités ci-après.

Il existe également des protéines pouvant se lier à l'ADN *via* des liaisons non-covalentes. C'est le cas, par exemple, de l'ADN des chromosomes dont la structure est garantie par son association avec de nombreuses protéines *via* des interactions électrostatiques.^[58] Ce type d'interaction ne sera pas détaillé.

a. Liaison ADN - Protéine

Deux catégories de protéines sont étudiées dans le domaine de ces biocapteurs. La première catégorie concerne les protéines impliquées dans la transcription.^[59] Ces protéines sont capables de se lier à une séquence spécifique de l'ADN afin d'activer ou d'inhiber la transcription du gène.^[60] Dans la seconde catégorie, on trouve des protéines qui se lient spécifiquement à un ADN monocaténaire afin de le stabiliser et de le protéger^[59] de la dégradation par des endonucléases.

Récemment *Ma et al*,^[57] a élaboré un biocapteur photoélectrochimique pour détecter la protéine de liaison à la TATA – box (TBP) en se basant sur l'interaction protéine – ADN. La TATA box est une séquence typique qui se trouve au début du site de transcription et qui est caractérisée par la séquence A-T-A-a/t-A-a/t (a/t signifiant A ou T). La protéine TBP reconnaît typiquement cette séquence TATA et se lie spécifiquement à elle. Pour réaliser ce biocapteur, une électrode d'ITO a été modifiée par des quantum dots de CdS sur lesquels un ADN double-brin a été hybridé. La reconnaissance de l'ADN par la protéine TBP induit une distorsion du duplex d'ADN, causant une gêne stérique impactant la diffusion du donneur sacrificiel (l'ascorbate de sodium) conduisant ainsi à une diminution de photocourant. Ainsi

une limite de détection de $0,04 \text{ ng.mL}^{-1}$ de protéine TBP a été obtenue avec une gamme de linéarité comprise entre $0,4$ et 400 ng.mL^{-1} .

b. Les enzymes modifiant la structure en double hélice de l'ADN

Les enzymes les plus connues modifiant la structure de l'ADN sont les nucléases, ligases, topoisomérases, hélicases et les polymérases.^[59]

Par exemple, Zauner et al,^[61] a développé un biocapteur pour détecter l'activité d'une ADN ligase dont le rôle est de rassembler les deux morceaux d'ADN lorsque l'un des deux brins d'ADN est coupé. Pour étudier l'activité de cette ADN ligase, un ADN sous forme d'épingle à cheveux (hairpine), présentant une cassure sur l'un des brins, est marqué avec un ferrocène. Cet ADN a été immobilisé sur une électrode d'or. En présence d'ADN ligase, les brins d'ADN seront rassemblés et le signal d'oxydation électrochimique du ferrocène sera visible en voltampérométrie cyclique, ce qui ne sera pas le cas en absence d'enzyme.

Une autre protéine utilisée pour réaliser des biocapteurs à ADN est la Fpg (Formamidopyrimidine ADN Glycosylase). Cette protéine a la particularité de reconnaître la 8-oxo-7,8-dihydro-2'-désoxyguanine (8-oxo-G). L'accumulation de 8-oxo-G dans l'organisme est utilisée comme marqueur de cancer et de maladies liées au stress oxydatif. Le diagnostic médical s'effectue en dosant les 8-oxo-G présents dans l'urine.^[62]

III. Biocapteurs électrochimiques à ADN à base de polymères électrogénérés

Dans la dernière partie de ce chapitre, nous allons nous intéresser aux biocapteurs élaborés à partir de polymères électrogénérés et à la transduction électrochimique. Nous aborderons plus particulièrement les systèmes qui ont été utilisés dans le cadre de ce travail, c'est à dire ceux qui concernent des interactions faisant intervenir l'ADN.

1. Les polymères électrogénérés

Les polymères électrogénérés sont obtenus après électropolymérisation (également appelé polymérisation électrochimique) des monomères. La plupart des films électrogénérés sont élaborés à partir de pyrrole, aniline et thiophène (Figure 19A). Ainsi, après polymérisation,

des films de polymères conducteurs sont obtenus : le poly-pyrrole, poly-aniline et poly-thiophène. Les structures des polymères sont représentées Figure 19.

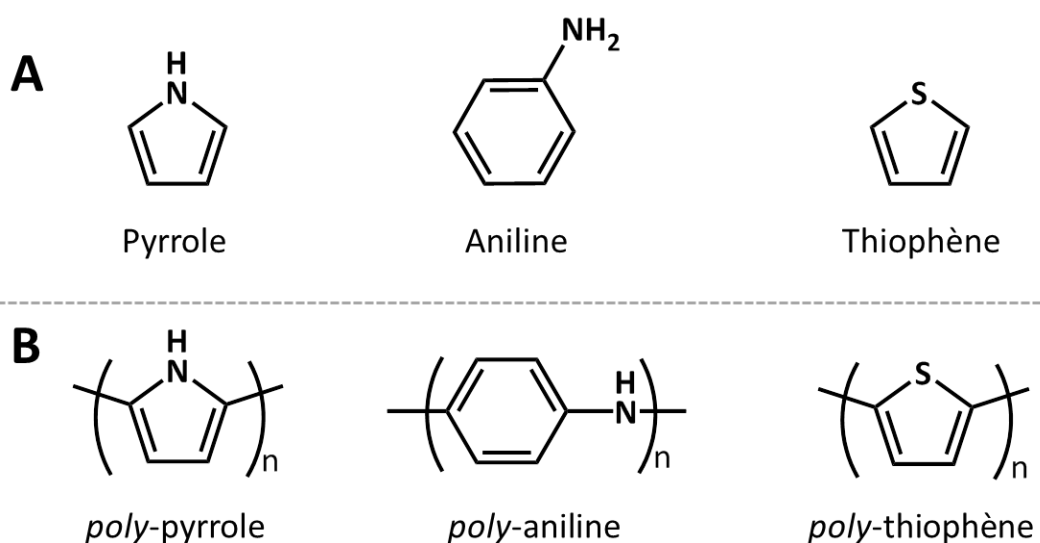


Figure 19. Structures chimiques (A) des monomères et (B) des polymères correspondant, obtenus après électropolymérisation.

Les polymères électrogénérés constituent une catégorie bien à part dans les techniques d'immobilisation de biorécepteurs. Il est en particulier possible de moduler les fonctions chimiques portées par les monomères ou le squelette du polymère afin de faire varier les propriétés finales du polymère, que ce soit au niveau de ces propriétés physico-chimiques, électrochimiques ou d'immobilisation de biomolécules.^[40] En effet, il est possible d'ajouter des groupements fonctionnels au monomère pyrrole pour, dans une seconde étape, greffer des biomolécules, que ce soit par greffage ou photogreffage covalent, ou interactions affines (avidine/biotin, adamantane/cyclodextrine ou Cu(NTA)/histidine).^[30,31,35]

De ce point de vue, l'utilisation de polymères électrogénérés est particulièrement flexible.^[63] L'immobilisation de biorécepteurs peut s'effectuer en une seule étape. En mélangeant le monomère de pyrrole, thiophène ou aniline avec la biomolécule à immobiliser et en appliquant le bon courant ou potentiel à l'électrode, les monomères vont s'oxyder pour former un film de polymère à la surface de l'électrode dans lequel les biomolécules vont être emprisonnées.^[37,64,65] Pour cette technique, il est en particulier nécessaire de synthétiser des monomères les plus hydrophiles possibles.

2. Généralités

Il y a un peu plus de 50 ans que le premier biocapteur électrochimique élaboré par Clark et Lyons a vu le jour. ^[66] La glucose oxydase était confinée à la surface d'une électrode de platine par une membrane de dialyse permettant la diffusion des substrats et des produits de la réaction. Ce dispositif a permis de mesurer différentes concentrations de glucose en détectant l'O₂ consommé au cours de l'oxydation du substrat par l'enzyme. Puis en 1967, Updike et Hicks^[67] ont présenté la première électrode avec une enzyme immobilisée : la glucose oxydase.

En 1968^[68], les premiers films de poly-pyrrole ont vu le jour. Les propriétés de ce polymère conducteur ont été étudiées par les équipes Diaz^[69] et de Bard^[70] notamment. La découverte de ce polymère a marqué un tournant important dans le domaine des biocapteurs électrochimiques. Puisque en 1986, Foulds et Lowe^[71] ainsi que Umana et Waller^[72] immobilisent pour la première fois la glucose oxydase, dans un film de poly-pyrrole. C'est ainsi qu'au début des années 1990^[73-75], des biomolécules (ADN et enzyme) ont été fonctionnalisées avec un pyrrole afin de les immobiliser directement sur une électrode.

Depuis les premiers travaux sur les biocapteurs amorcés en 1962, le nombre de biocapteurs électrochimiques à ADN élaboré n'a cessé d'augmenter, comme en témoigne la Figure 20 recensant le nombre de publications traitant de ce type de biocapteur.

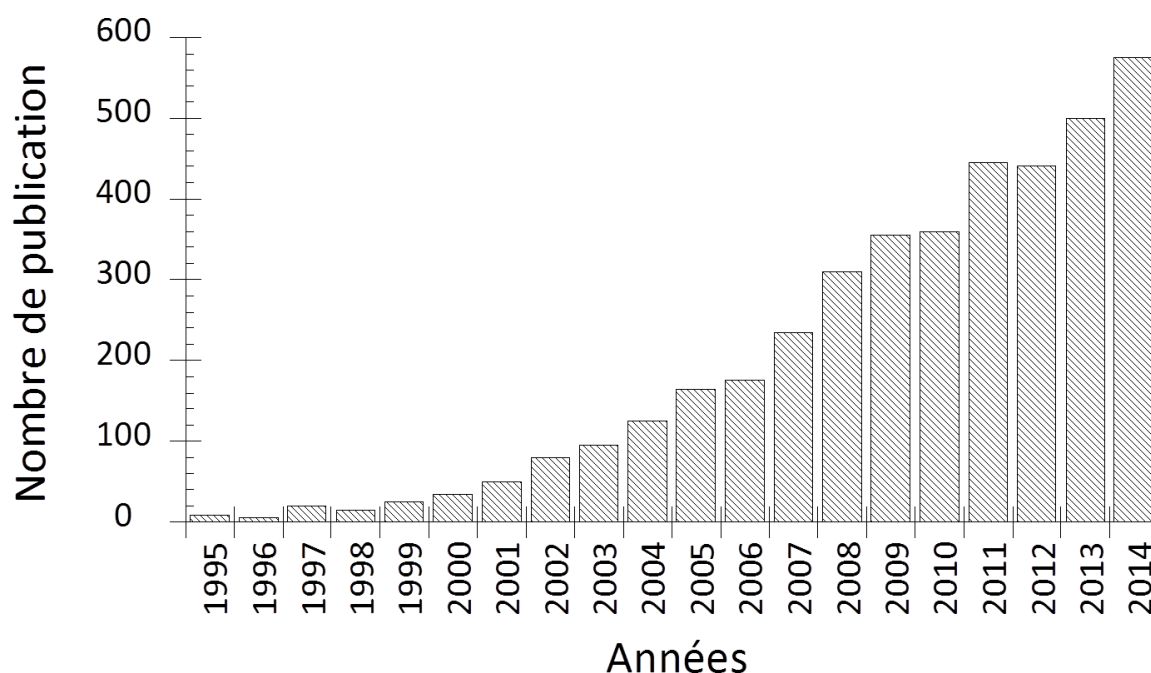


Figure 20. Évolution du nombre de publication d'articles entre 1995 et 2015 traitant des biocapteurs électrochimiques à ADN. Recherche effectuée avec les mots clés « DNA electrochemical biosens* ». Source : Web of Knowledge, édité en Octobre 2015.

Les biocapteurs électrochimiques à ADN diffèrent par le type d'interaction de la couche sensible avec l'ADN. Ainsi, les biocapteurs peuvent reconnaître un ADN cible présent dans un échantillon donné. Les aptamères qui sont des oligonucléotides peuvent également être utilisés. Certains biorécepteurs de ce type de biocapteur sont des protéines qui peuvent reconnaître des duplex d'ADN voire même des lésions de celui-ci.

3. Les biocapteurs à ADN

La conformation la plus étudiée pour un biocapteur à ADN élaboré à base de polymère conducteur est présentée Figure 21. Le brin d'ADN sonde est immobilisé soit à l'intérieur du film de polymère soit sur le film de polymère. L'appariement entre l'ADN sonde et l'ADN cible génère un signal qui sera transmis par l'électrode. La reconnaissance a lieu à l'interface polymères conducteurs / électrolyte. L'orientation de l'ADN sonde est essentiel pour la performance du biocapteur.^[76] Les propriétés de transduction peuvent être apportées par le polymère lui-même, par une entité rédox greffée sur le polymère, par une sonde présente en solution ou par un marqueur de l'ADN. La méthode électrochimique employée (spectroscopie d'impédance électrochimique, photoélectrochimie, voltammétrie à impulsion différentielle, etc...) dépend alors de ces propriétés.

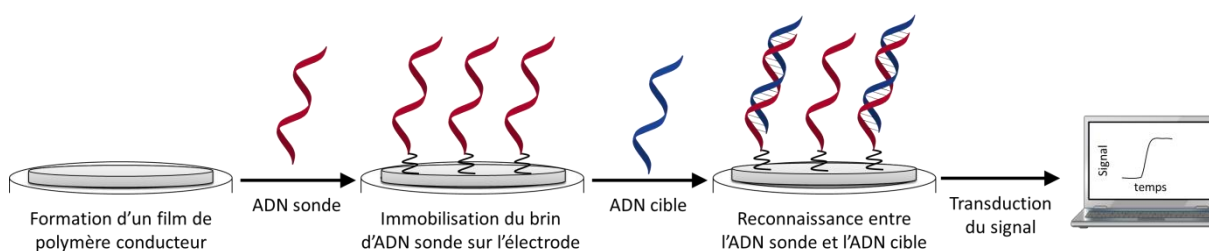


Figure 21. Principe général d'élaboration d'un biocapteur à ADN construit à base de polymère électrogénéré.

Plusieurs méthodes d'immobilisation de l'ADN ont été envisagées et sont présentées sur la Figure 22.

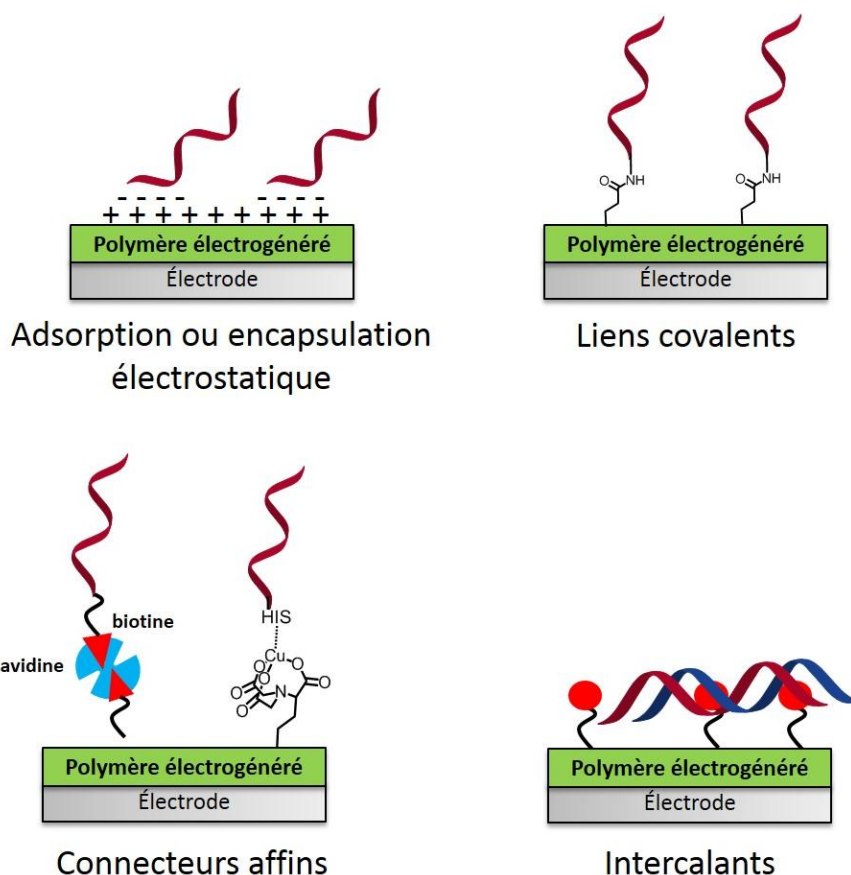


Figure 22. Les principaux modes d'immobilisation d'ADN sonde lors de l'élaboration de biocapteurs à base de polymères électrogénérés

La plus étudiée est l'immobilisation de l'ADN sonde soit par piégeage ou par adsorption dans un film de polymère tel que le poly-pyrrole^[72,77,78]. L'ADN peut ainsi être utilisé comme contre-ion durant l'électropolymérisation^[79,80] ou adsorbé par interactions électrostatiques.^[81] L'hybridation est alors détectée par des changements dans la conductivité du polymère^[77,80] ou par l'ajout d'un marqueur^[82]. La transduction de l'hybridation est alors finalement observé en spectroscopie d'impédance électrochimique^[83] ou en voltammétrie à impulsion différentielle^[82,84,85]. Des aptacapteurs basés sur ce type d'immobilisation ont également été développés.^[81]

Ensuite, la synthèse de nouveaux monomères et l'addition de groupes fonctionnels ont permis d'immobiliser des oligonucléotides par une liaison covalente, en particulier en utilisant des polymères électrogénérés possédant des fonctions acide carboxylique ou N-hydrosuccinimide^[75,79,86-89]. Enfin, des méthodes non-covalentes, basés sur des systèmes affins précédemment décrit , permettent d'immobiliser des oligonucléotides préalablement marqués par affinité via des système du biotine/(strep)avidine)^[90-92], NTA/Cu²⁺/histidine^[7] et NTA/Cu²⁺/biotine^[93,94]. Ces biocapteurs ont majoritairement été conçus pour la détection de

l'hybridation d'ADN. Cependant, ils se tournent de plus en plus vers la reconnaissance aptamère/molécule cible, que ce soit *via* une détection par spectroscopie d'impédance électrochimique^[95] ou par photoélectrochimie^[93]. Des polymères possédant des propriétés d'intercalation ont également permis d'immobiliser des duplex d'ADN pour la détection électrochimique de l'hybridation *via* un marquage par une enzyme et une détection chronoampérométrique^[96] ou *via* la modification du monomère par une sonde rédox et une détection par voltammétrie à ondes carrées^[97].

IV. Bibliographie

- [1] R. Villalonga, R. Cao, A. Fragoso, *Chem. Rev.* **2007**, *107*, 3088–3116.
- [2] P. Fabry, C. Gondran, *Capteurs électrochimiques : Fonctionnement, Utilisation, Conceptions*, Ellipses, Paris, **2008**.
- [3] S. Da Silva, L. Grosjean, N. Ternan, P. Mailley, T. Livache, S. Cosnier, *Bioelectrochemistry* **2004**, *63*, 297–301.
- [4] P. Vadgama, P. W. Crump, *The Analyst* **1992**, *117*, 1657.
- [5] S. Cosnier, *Electroanalysis* **2005**, *17*, 1701–1715.
- [6] F. Giroud, K. Gorgy, C. Gondran, S. Cosnier, D. G. Pinacho, M.-P. Marco, F. J. Sánchez-Baeza, *Anal. Chem.* **2009**, *81*, 8405–8409.
- [7] J. Baur, C. Gondran, M. Holzinger, E. Defrancq, H. Perrot, S. Cosnier, *Anal. Chem.* **2010**, *82*, 1066–1072.
- [8] A. Sassolas, B. D. Leca-Bouvier, L. J. Blum, *Chem. Rev.* **2008**, *108*, 109–139.
- [9] S. Cosnier, P. Mailley, *The Analyst* **2008**, *133*, 984.
- [10] M. Lazerges, H. Perrot, N. Zeghib, E. Antoine, C. Compere, *Sens. Actuators B Chem.* **2006**, *120*, 329–337.
- [11] P. S. Sharma, Z. Iskierko, A. Pietrzyk-Le, F. D'Souza, W. Kutner, *Electrochem. Commun.* **2015**, *50*, 81–87.
- [12] A. Sassolas, L. J. Blum, B. D. Leca-Bouvier, *Electroanalysis* **2009**, *21*, 1237–1250.
- [13] A. Sassolas, L. J. Blum, B. D. Leca-Bouvier, *Biotechnol. Adv.* **2012**, *30*, 489–511.
- [14] F. M. Richards, J. R. Knowles, *J. Mol. Biol.* **1968**, *37*, 231–233.
- [15] I. Migneault, C. Dartiguenave, M. J. Bertrand, K. C. Waldron, *Biotechniques* **2004**, *37*, 790–806.
- [16] T. de Lumley-Woodyear, P. Rocca, J. Lindsay, Y. Dror, A. Freeman, A. Heller, *Anal. Chem.* **1995**, *67*, 1332–1338.
- [17] R. A. Sheldon, S. van Pelt, *Chem Soc Rev* **2013**, *42*, 6223–6235.
- [18] A. Sassolas, L. J. Blum, B. D. Leca-Bouvier, *Anal. Bioanal. Chem.* **2009**, *394*, 971–980.
- [19] B. Krajewska, *Enzyme Microb. Technol.* **2004**, *35*, 126–139.
- [20] T. Klotzbach, M. Watt, Y. Ansari, S. D. Minteer, *J. Membr. Sci.* **2006**, *282*, 276–283.
- [21] K. A. Heyries, C. A. Mandon, L. Ceriotti, J. Ponti, P. Colpo, L. J. Blum, C. A. Marquette, *Biosens. Bioelectron.* **2009**, *24*, 1146–1152.
- [22] S. Cosnier, A. Senillou, *Chem. Commun.* **2003**, 414–415.
- [23] L. Coche-Guérente, S. Cosnier, P. Labbé, *Chem. Mater.* **1997**, *9*, 1348–1352.
- [24] A. K. de Brito, C. S. F. Nordi, L. Caseli, *Colloids Surf. B Biointerfaces* **2015**, *135*, 639–645.
- [25] S. Liu, H. Ju, *Biosens. Bioelectron.* **2003**, *19*, 177–183.
- [26] M. Halma, C. Mousty, C. Forano, M. Sancelme, P. Besse-Hoggan, V. Prevot, *Colloids Surf. B Biointerfaces* **2015**, *126*, 344–350.
- [27] S. Takahashi, K. Sato, J. Anzai, *Anal. Bioanal. Chem.* **2012**, *402*, 1749–1758.
- [28] G. V. Dubacheva, A. Van Der Heyden, P. Dumy, O. Kaftan, R. Auzély-Velty, L. Coche-Guerente, P. Labbé, *Langmuir* **2010**, *26*, 13976–13986.
- [29] M. Holzinger, L. Bouffier, R. Villalonga, S. Cosnier, *Biosens. Bioelectron.* **2009**, *24*, 1128–1134.
- [30] R. Haddad, M. Holzinger, R. Villalonga, A. Neumann, J. Roots, A. Maaref, S. Cosnier, *Carbon* **2011**, *49*, 2571–2578.
- [31] N. Haddour, S. Cosnier, C. Gondran, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 5752–5753.

- [32] M. Singh, M. Holzinger, M. Tabrizian, S. Winters, N. C. Berner, S. Cosnier, G. S. Duesberg, *J. Am. Chem. Soc.* **2015**, *137*, 2800–2803.
- [33] M. Holzinger, A. L. Goff, S. Cosnier, *New J. Chem.* **2014**, DOI 10.1039/C4NJ00755G.
- [34] S. Cosnier, B. Galland, C. Gondran, A. Le Pellec, *Electroanalysis* **1998**, *10*, 808–813.
- [35] S. Cosnier, A. Lepellec, *Electrochimica Acta* **1999**, *44*, 1833–1836.
- [36] R. Blankespoor, B. Limoges, B. Schöllhorn, J.-L. Syssa-Magalé, D. Yazidi, *Langmuir* **2005**, *21*, 3362–3375.
- [37] S. Cosnier, *Anal. Lett.* **2007**, *40*, 1260–1279.
- [38] D. Samanta, A. Sarkar, *Chem. Soc. Rev.* **2011**, *40*, 2567–2592.
- [39] V. Balland, C. Hureau, A. M. Cusano, Y. Liu, T. Tron, B. Limoges, *Chem. – Eur. J.* **2008**, *14*, 7186–7192.
- [40] M. Holzinger, A. Le Goff, S. Cosnier, *Front. Chem.* **2014**, *2*, DOI 10.3389/fchem.2014.00063.
- [41] L. S. Wong, F. Khan, J. Micklefield, *Chem. Rev.* **2009**, *109*, 4025–4053.
- [42] M. B. Soellner, K. A. Dickson, B. L. Nilsson, R. T. Raines, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 11790–11791.
- [43] F. Rusmini, Z. Zhong, J. Feijen, *Biomacromolecules* **2007**, *8*, 1775–1789.
- [44] D. Voët, J. Voët, *Biochimie, 2 édition. Édité Par De Boeck et Larcier*, ISBN 978-2-8041-4795-2. 1^{ère} édition, **2005**.
- [45] A. D. Ellington, J. W. Szostak, *Nature* **1990**, *346*, 818–822.
- [46] C. Tuerk, L. Gold, *Science* **1990**, *249*, 505–510.
- [47] D. L. Robertson, G. F. Joyce, *Nature* **1990**, *344*, 467–468.
- [48] A. Sassolas, L. J. Blum, B. D. Leca-Bouvier, *The Analyst* **2011**, *136*, 257–274.
- [49] P. Fan, A. K. Suri, R. Fiala, D. Live, D. J. Patel, *J. Mol. Biol.* **1996**, *258*, 480–500.
- [50] J. R. Lorsch, J. W. Szostak, *Biochemistry (Mosc.)* **1994**, *33*, 973–982.
- [51] R. F. Macaya, P. Schultze, F. W. Smith, J. A. Roe, J. Feigon, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1993**, *90*, 3745–3749.
- [52] M. Girardot, P. Gareil, A. Varenne, *ELECTROPHORESIS* **2010**, *31*, 546–555.
- [53] F. Radom, P. M. Jurek, M. P. Mazurek, J. Otlewski, F. Jeleń, *Biotechnol. Adv.* **2013**, *31*, 1260–1274.
- [54] A. Hayat, J. L. Marty, *Front. Chem.* **2014**, *2*, DOI 10.3389/fchem.2014.00041.
- [55] E. Torres-Chavolla, E. C. Alocilja, *Biosens. Bioelectron.* **2009**, *24*, 3175–3182.
- [56] A. Sassolas, L. J. Blum, B. D. Leca-Bouvier, *Biosens. Bioelectron.* **2011**, *26*, 3725–3736.
- [57] Z.-Y. Ma, Y.-F. Ruan, N. Zhang, W.-W. Zhao, J.-J. Xu, H.-Y. Chen, *Chem. Commun.* **2015**, *51*, 8381–8384.
- [58] K. Luger, A. W. Mäder, R. K. Richmond, D. F. Sargent, T. J. Richmond, *Nature* **1997**, *389*, 251–260.
- [59] W.-W. Zhao, J.-J. Xu, H.-Y. Chen, *Chem. Rev.* **2014**, *114*, 7421–7441.
- [60] L. C. Myers, R. D. Kornberg, *Annu. Rev. Biochem.* **2000**, *69*, 729–749.
- [61] G. Zauner, Y. Wang, M. Lavesa-Curto, A. MacDonald, A. G. Mayes, R. P. Bowater, J. N. Butt, *The Analyst* **2005**, *130*, 345.
- [62] Y. Wu, X. Yang, B. Zhang, L.-H. Guo, *Biosens. Bioelectron.* **2015**, *69*, 235–240.
- [63] S. Cosnier, M. Holzinger, *Chem. Soc. Rev.* **2011**, *40*, 2146.
- [64] S. Cosnier, *Biosens. Bioelectron.* **1999**, *14*, 443–456.
- [65] S. Cosnier, *Appl. Biochem. Biotechnol.* **2000**, *89*, 127–138.
- [66] L. C. Clark, C. Lyons, *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1962**, *102*, 29–45.
- [67] S. J. Updike, G. P. Hicks, *Nature* **1967**, *214*, 986–988.

- [68] A. Dall'Olio, G. Dascola, V. Vacara, V. Bocchi, *CR Acad Sci Paris* **1968**, 267, 433–435.
- [69] A. F. Diaz, K. K. Kanazawa, G. P. Gardini, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1979**, 635–636.
- [70] R. A. Bull, F.-R. F. Fan, A. J. Bard, *J. Electrochem. Soc.* **1982**, 129, 1009–1015.
- [71] N. C. Foulds, C. R. Lowe, *J. Chem. Soc. Faraday Trans. 1 Phys. Chem. Condens. Phases* **1986**, 82, 1259–1264.
- [72] M. Umana, J. Waller, *Anal. Chem.* **1986**, 58, 2979–2983.
- [73] W. Schuhmann, R. Lammert, B. Uhe, H.-L. Schmidt, *Sens. Actuators B Chem.* **1990**, 1, 537–541.
- [74] S. E. Wolowacz, B. F. Y. Yon Hin, C. R. Lowe, *Anal. Chem.* **1992**, 64, 1541–1545.
- [75] T. Livache, A. Roget, E. Dejean, C. Barthet, G. Bidan, R. Teoule, *Nucleic Acids Res.* **1994**, 22, 2915–2921.
- [76] H. Peng, L. Zhang, C. Soeller, J. Travas-Sejdic, *Biomaterials* **2009**, 30, 2132–2148.
- [77] J. Wang, M. Jiang, *Langmuir* **2000**, 16, 2269–2274.
- [78] M. Jiang, J. Wang, *J. Electroanal. Chem.* **2001**, 500, 584–589.
- [79] Y. Xu, X. Ye, L. Yang, P. He, Y. Fang, *Electroanalysis* **2006**, 18, 1471–1478.
- [80] J. Wang, M. Jiang, A. Fortes, B. Mukherjee, *Anal. Chim. Acta* **1999**, 402, 7–12.
- [81] A. V. Porfireva, G. A. Evtugyn, A. N. Ivanov, T. Hianik, *Electroanalysis* **2010**, 22, 2187–2195.
- [82] H. Qi, X. Li, P. Chen, C. Zhang, *Talanta* **2007**, 72, 1030–1035.
- [83] H. Peng, C. Soeller, M. B. Cannell, G. A. Bowmaker, R. P. Cooney, J. Travas-Sejdic, *Biosens. Bioelectron.* **2006**, 21, 1727–1736.
- [84] Y. Zhang, K. Zhang, H. Ma, *Anal. Biochem.* **2009**, 387, 13–19.
- [85] K. Ghanbari, S. Z. Bathaie, M. F. Mousavi, *Biosens. Bioelectron.* **2008**, 23, 1825–1831.
- [86] A. C. Ontko, P. M. Armistead, S. R. Kircus, H. H. Thorp, *Inorg. Chem.* **1999**, 38, 1842–1846.
- [87] R. E. Ionescu, S. Herrmann, S. Cosnier, R. S. Marks, *Electrochem. Commun.* **2006**, 8, 1741–1748.
- [88] F. Garnier, H. Korri-Youssoufi, P. Srivastava, B. Mandrand, T. Delair, *Synth. Met.* **1999**, 100, 89–94.
- [89] H. Q. A. Lê, S. Chebil, B. Makrouf, H. Sauriat-Dorizon, B. Mandrand, H. Korri-Youssoufi, *Talanta* **2010**, 81, 1250–1257.
- [90] G. Bidan, M. Billon, K. Galasso, T. Livache, C. Mathis, A. Roget, L. M. Torres-Rodriguez, E. Vieil, *Appl. Biochem. Biotechnol.* **2000**, 89, 183–193.
- [91] K. Ramanathan, M. A. Bangar, M. Yun, W. Chen, N. V. Myung, A. Mulchandani, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, 127, 496–497.
- [92] A. Dupont-Filliard, M. Billon, T. Livache, S. Guillerez, *Anal. Chim. Acta* **2004**, 515, 271–277.
- [93] W. Yao, A. Le Goff, N. Spinelli, M. Holzinger, G.-W. Diao, D. Shan, E. Defrancq, S. Cosnier, *Biosens. Bioelectron.* **2013**, 556–562.
- [94] J. Baur, M. Holzinger, C. Gondran, S. Cosnier, **2010**, 1287–1290.
- [95] H. Xu, K. Gorgy, C. Gondran, A. Le Goff, N. Spinelli, C. Lopez, E. Defrancq, S. Cosnier, *Biosens. Bioelectron.* **2013**, 90–95.
- [96] S. Cosnier, R. E. Ionescu, S. Herrmann, L. Bouffier, M. Demeunynck, R. S. Marks, **2006**, 7054–7057.
- [97] N. C. Tansil, E. A. B. Kantchev, Z. Gao, H. Yu, *Chem. Commun.* **2011**, 47, 1533–1535.

Étude de l'interaction d'un ADN double-brin avec une surface modifiée par une protéine de réparation: la Fpg (Formamidopyrimidine ADN Glycosylase) de *Deinococcus radiodurans*

ÉTUDE DE L'INTERACTION D'UN ADN DOUBLE-BRIN AVEC UNE SURFACE MODIFIÉE PAR UNE PROTÉINE DE RÉPARATION: LA FPG (FORMAMIDOPYRIMIDINE ADN GLYCOSYLASE) DE *DEINOCOCCUS RADIODURANS*..... 32

I.	GÉNÉRALITÉS	34
1.	<i>Dommages causés à l'ADN</i>	34
a.	Facteurs d'agression de l'ADN	34
b.	Les systèmes de réparation de l'ADN	35
	• Réparation par recombinaison	35
	• Réparation par excision resynthèse.....	36
2.	<i>Une protéine de réparation de l'ADN : la Formamidopyrimidine ADN Glycosylase (Fpg) de <i>Deinococcus radiodurans</i></i>	37
3.	<i>Contexte de l'étude</i>	40
4.	<i>Techniques utilisées</i>	41
a.	Spectroscopie d'impédance électrochimique (SIE)	41
	• Représentation de Nyquist des électrochimistes	44
	• Le choix du circuit électrique équivalent	45
	• Ajustement du circuit équivalent aux données expérimentales : L'élément à Phase Constante (CPE - Constant Phase Element)	48
b.	La résonance des plasmons de surface (SPR).....	49
II.	CARACTÉRISATION DU PYRROLE-NTA ET DU POLY-(PYRROLE-NTA)	53
1.	<i>Électrochimie du monomère en solution</i>	53
2.	<i>Électropolymérisation du pyrrole-NTA</i>	54
3.	<i>Évaluation de la polymérisation du poly(pyrrole-NTA)</i>	56
4.	<i>Impédance du film de poly(pyrrole-NTA)</i>	58
III.	ÉTUDE DE L'INTERACTION DE LA PROTÉINE FPG AVEC UN DOUBLE-BRIN D'ADN SANS LÉSION PAR DES MÉTHODES ÉLECTROCHIMIQUES	61
1.	<i>Les différentes étapes d'élaboration du biocapteur</i>	61
2.	<i>Immobilisation des deux protéines Nt-His-Fpg et Fpg-His-Ct sur le poly(pyrrole NTA)</i>	62
a.	Immobilisation de la protéine Nt-His-Fpg	62
b.	Immobilisation de la protéine Fpg-His-Ct	66
3.	<i>Interaction des protéines avec le duplex d'ADN sans lésion</i>	72
a.	Interaction de la protéine Nt-His-Fpg avec un duplex d'ADN sans lésion	72
b.	Interaction entre la protéine Ct-His-Fpg et un duplex d'ADN	74

4.	<i>Élaboration du biocapteur pour la détection de l'ADN par la protéine Fpg-His-Ct</i>	78
a.	Détection par impédancemétrie	78
b.	Détection par conductimétrie	81
IV.	ÉTUDE DE L'INTERACTION DE LA PROTÉINE FPG AVEC UN DOUBLE-BRIN D'ADN AVEC LÉSIONS	83
V.	CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES	86
VI.	BIBLIOGRAPHIE	87
VII.	EXPERIMENTAL PART	89

I. Généralités

1. Dommages causés à l'ADN

a. Facteurs d'agression de l'ADN

L'ADN est le support de l'information génétique et est universel. Il arrive que cette molécule subisse des dommages lorsqu'elle est exposée à des facteurs d'agression.

Les lésions de l'ADN peuvent être causées par des agents environnementaux tels que les radiations UV ou ionisantes ou des produits chimiques. L'ADN peut également être endommagé par des sous-produits du métabolisme cellulaire tels que les espèces réactives de l'oxygène (Reactive Oxygen Species ou ROS) issus de la respiration et des produits de la peroxydation des lipides.^[1] Les ROS majeurs sont le radical anion superoxyde $O_2^{\bullet-}$, le radical hydroxyle HO^{\bullet} et le peroxyde d'hydrogène H_2O_2 . Le radical hydroxyle HO^{\bullet} est l'espèce radicalaire qui génère des modifications des bases ou des sucres de l'ADN.^[2-4]

Les radicaux libres formés au niveau des bases et des sucres subissent une suite de réactions de réarrangement et d'oxydation qui conduisent à l'oxydation voire à la dégradation ou l'élimination des bases nucléiques et du squelette ribose-phosphate.^[5] Parmi les dizaines de produits identifiés, on trouve un grand nombre de bases oxydées telle que la 8-oxo-7,8-dihydroguanine (8-oxoguanine ou 8-oxo-G).^[2,6] et divers sites abasiques tel que le 2' désoxyribose (dR) qui résultent de la perte de la base nucléique (Figure 23).

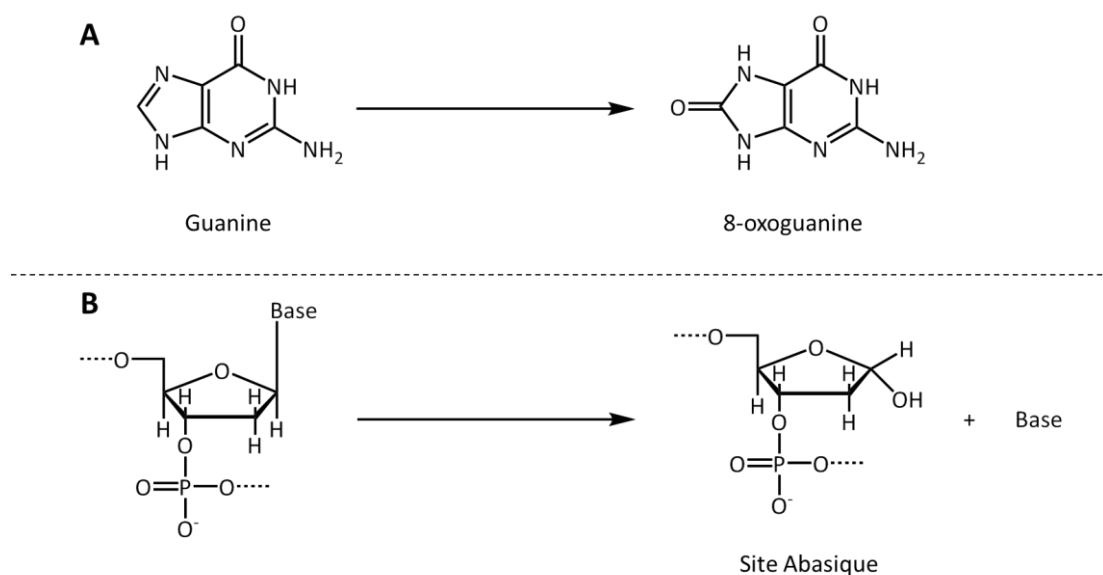


Figure 23. Exemples de modification de l'ADN suites à des radiations ionisantes induisant la formation de : (A). 8-hydroxyguanine (8-oxo-G), (B). site abasique (dR).

Ces lésions peuvent être localisées sur un même brin ou sur les deux brins complémentaires. On les nomme lésions en tandem, lorsqu'elles sont sur un même brin, ou lésions bicaténares lorsqu'elles sont sur deux brins appariés. Ces groupes de lésions sont appelés clusters ou MDS (Multiple Damaged Site).^[7]

À terme, ces lésions peuvent conduire à des mutations qui altèrent le code génétique. Cette instabilité génétique peut être la cause de nombreuses pathologies (cancer, maladie d'Alzheimer...). C'est pourquoi, certaines de ces lésions comme la 8-Oxo-G peuvent servir de marqueur pour le diagnostic de ces pathologies.^[3]

b. Les systèmes de réparation de l'ADN

Il a ainsi été estimé qu'une lésion sur mille conduit à une mutation.^[8] Ces mutations peuvent entraîner la mort de la cellule si celles-ci ne sont pas réparées. C'est pourquoi, il existe dans les cellules, différents mécanismes permettant de préserver l'intégrité de l'ADN. Ces mécanismes font intervenir des protéines dont le rôle est de réparer l'ADN. Ces voies de réparation sont spécifiques de la nature de la lésion rencontrée. Elles peuvent être classées en deux catégories : la réparation par recombinaison et la réparation par excision resynthèse

- Réparation par recombinaison

- **Recombinaison homologue** (Homologous Recombination ou HR)

Ce système de réparation intervient lors de la rupture totale de la double hélice d'ADN induisant la cassure des deux brins. La réparation s'effectue *via* un système utilisant un brin de séquence identique et permet une réparation très fidèle.^[8] C'est ce qu'on appelle la recombinaison homologue.

- **Recombinaison non-homologue** (Non Homologous End Joining ou NHEJ)

Ce processus de réparation par recombinaison non-homologue va également intervenir lors de la cassure de la double-hélice d'ADN. Cette réparation consiste à relier les extrémités des double-brins d'ADN générés par la cassure, ce qui entraîne la perte de quelques nucléotides.

- Réparation par excision resynthèse

- **Réparation des mésappariements** (MisMatch Repair ou MMR).

Ce système de réparation intervient lorsqu'il y a une absence de complémentarité entre deux nucléotides se trouvant à la même position sur les brins d'ADN.

- **Réparation par Excision de Base** (Base Excision Repair ou BER)

Lorsqu'une base de l'ADN est altérée suite à une désamination, oxydation ou alkylation, la base endommagée est excisée pour former un site abasique intermédiaire. Ce mécanisme sera décrit un peu plus loin. La voie BER est l'un des systèmes de réparation le plus utilisé pour la réparation de l'ADN.^[9]

- **Réparation par Excision de Nucléotides** (Nucleotide Excision Repair ou NER)

Lorsqu'un fragment d'ADN (24-32 nucléotides^[3]) possède des lésions encombrées, il y a une malformation de la double hélice au niveau des oligonucléotides endommagés. La réparation de l'ADN consiste à retirer plusieurs nucléotides dont celui endommagé et à en synthétiser de nouveaux.^[3]

Le Tableau 1 récapitule les voies de réparation des lésions de l'ADN en fonction du facteur d'agression qui induit la lésion.

Tableau 1. Récapitulatif des mécanismes de réparation intervenant suite aux lésions de l'ADN.

Facteurs d'agression de l'ADN	ROS Radiations ionisantes Agents alkylants		UV ROS	Erreurs de réplication
	Base altérée Site abasique Cassure brin d'ADN	Cassure du double-brin d'ADN	Dimères pyrimidine sur le même brin d'ADN Formation d'adduits	Mésappariement de base Insertions Délétions
Mécanisme de réparation	BER	HR ou NHEJ	NER	MMR

Ces voies de réparation fonctionnent pratiquement toutes sur le même principe. Dans un premier temps, la lésion est reconnue puis excisée par une ADN Glycosylase. Puis dans un second temps, la zone lésée est remplacée grâce à l'action d'ADN polymérases et d'ADN ligases.

2. Une protéine de réparation de l'ADN : la Formamidopyrimidine ADN Glycosylase (Fpg) de *Deinococcus radiodurans*

Dans le cadre de cette étude, nous nous sommes intéressés à une des protéines de réparation de l'ADN : l'ADN Glycosylase de l'espèce *Deinococcus radiodurans*. La bactérie *Deinococcus radiodurans* a la particularité d'être extrêmement résistante aux effets mutagènes induits par les radiations ionisantes et UV ainsi qu'aux ROS.^[10]

L'ADN Glycosylase de l'espèce *Deinococcus radiodurans* : la Formamidopyrimidine ADN Glycosylase (Fpg), également connue sous le nom de 8-hydroxyguanine endonuclease ^[6] et de MutM.^[3] va initier la réparation d'une base altérée de l'ADN *via* le mécanisme de BER. En effet, lorsqu'une guanine de l'ADN est oxydée en 8-oxo-G, la Fpg hydrolyse la liaison N-glycosidique de la base endommagée. Il en résulte la formation d'un site abasique (site AP) intermédiaire.^[3,4,11] La Fpg possède également une activité AP-lyase. Ainsi après excision de la base endommagée, la liaison 3'-phosphodiester du site abasique est hydrolysée selon un mécanisme de β -élimination, générant une extrémité 3' aldéhyde insaturé et 5'phosphate.^[4] Puis le produit de dégradation du sucre est excisé et le ou les nucléotides manquants sont remplacés par une ADN polymérase. La liaison phosphodiester est restaurée par une ADN ligase.

Cette réaction implique la formation d'une base de Schiff avec la proline se situant du côté N-terminal de la protéine Fpg (Figure 24).

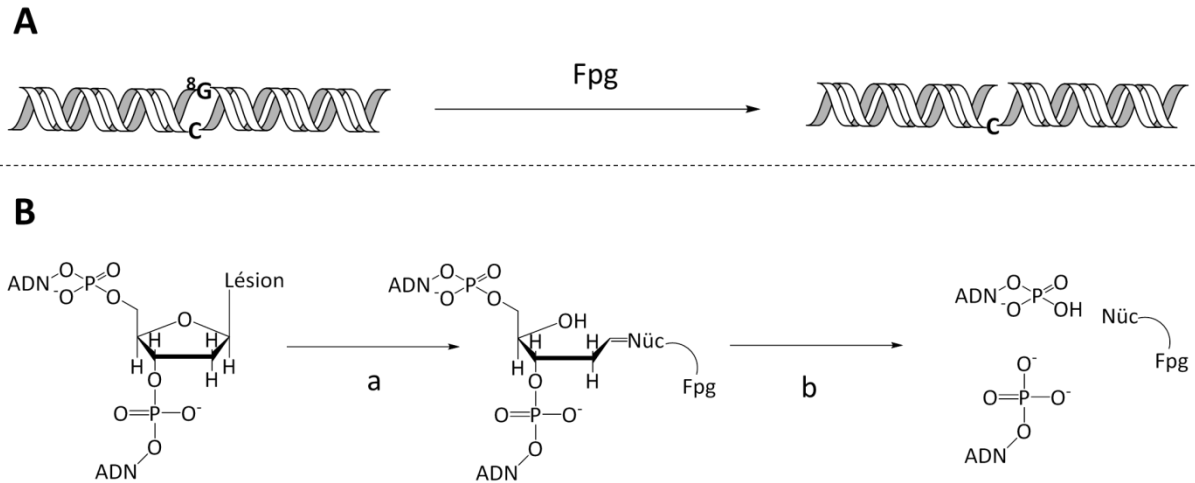


Figure 24. (A). Illustration du mécanisme de réparation de l'ADN par la Fpg. **(B).** Une fois la lésion reconnue par la Fpg, celle-ci va se lier au nucléotide endommagé en formant une base de Schiff (a), créant ainsi une coupure en 3' et 5' du simple brin d'ADN (b). Adapté de Fromme et al.^[9,12]

Pour réaliser cette étude, nous disposons d'une Fpg de *Deinococcus radiodurans* possédant soit une étiquette tag composée de six histidines soit du côté N-terminal soit du côté C-terminal. Afin de pouvoir parler de ces deux protéines plus facilement, la Fpg possédant un tag histidine du côté N-terminal sera appelé Nt-His-Fpg et celle possédant l'étiquette tag histidine du côté C-terminal, Ct-His-Fpg. La structure schématique du gène codant pour les Fpg utilisées est présentée Figure 25. Le gène de la Fpg code pour une protéine de 273 acides aminés dont la masse molaire est de 34,8 kDa dont la simulation de la structure 3D est donnée Figure 26.

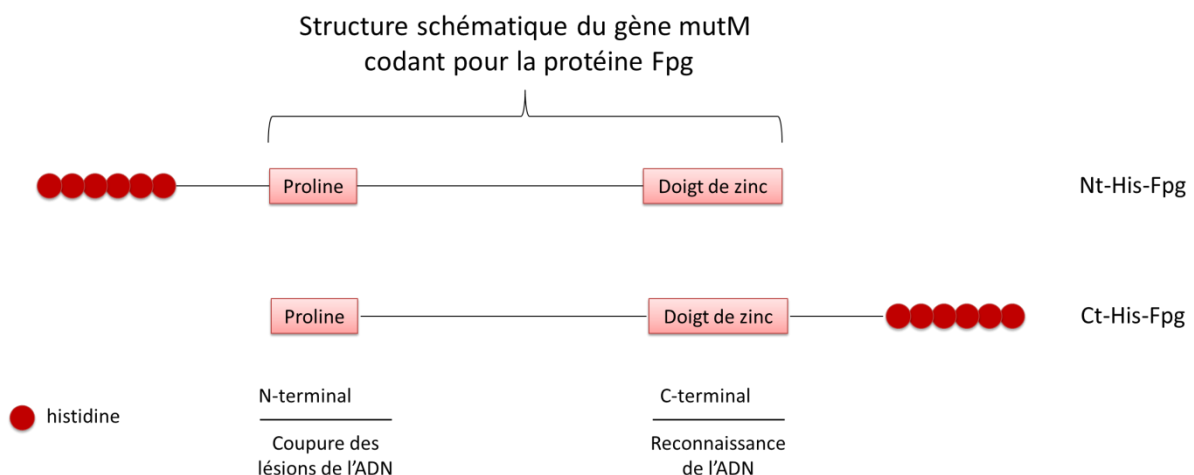


Figure 25. Structure schématique du gène utilisé pour la production des deux protéines Fpg

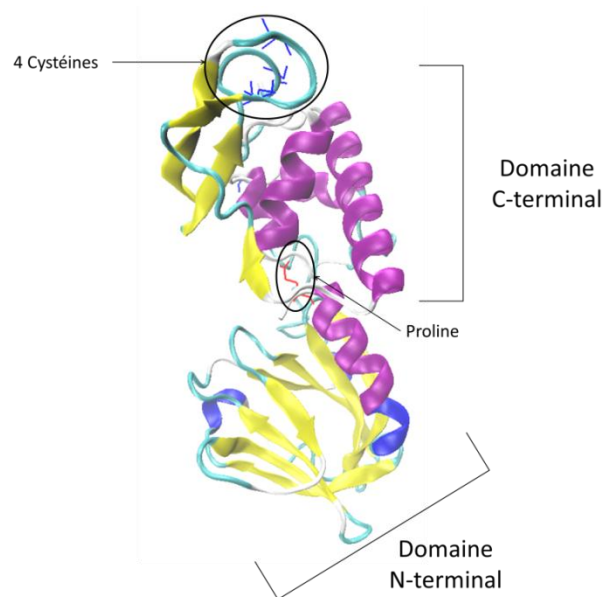


Figure 26. Structure tridimensionnelle prédictive de la Fpg de *Deinococcus radiodurans* obtenue par homologie de séquence avec le programme PHYRE 2.

La protéine Fpg est composée de deux domaines bien distincts reliés par une charnière centrale. Le domaine N-terminal de la Fpg est composé de huit feuillets β et de deux hélices α et le domaine C-terminal de quatre hélices α , de deux feuillets β et de 4 cystéines qui forment un motif en doigt de zinc dont le rôle est de lier l'ADN endommagé.

Cette protéine est capable de reconnaître et de réparer la 8-oxo-G et un site abasique contenus dans des clusters bicaténaires de lésions généralement composés de sites abasiques et de bases oxydées et qui figurent parmi les lésions les plus nocives pour la cellule car ils peuvent conduire à la formation de cassures du double-brin d'ADN. C'est pourquoi, nous avons choisi de travailler avec un double-brin d'ADN contenant un site abasique (2'-désoxyribose ou dR) et une 8-oxoguanine (8-oxo-G). Nous nous sommes donc intéressés à l'interaction de la Fpg avec un ADN double-brin sans lésion (Figure 27A) et un ADN double-brin composé d'un cluster bicaténaire de lésion (Figure 27B).

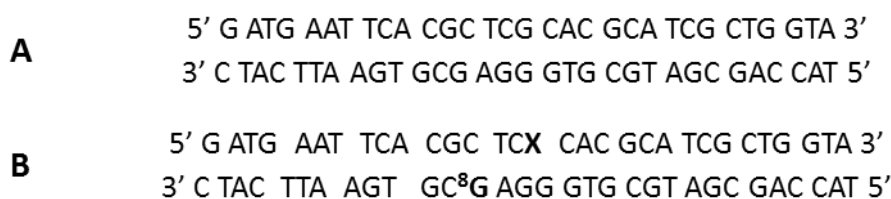


Figure 27. Séquence d'ADN double-brin A. sans lésion, B. avec un cluster bicaténaire de lésions composé d'un site abasique (X) et d'une 8-oxoguanine (⁸G).

3. Contexte de l'étude

L'originalité de ce travail repose sur l'étude du comportement de la Fpg en milieu hétérogène avec un ADN double-brin comportant, ou non, des lésions. Pour réaliser cette étude, la protéine Fpg de *Deinococcus radiodurans* a été immobilisée sur une électrode fonctionnalisée avec un polymère de pyrrole-NTA (acide nitrilotriacétique).

En général, la caractérisation de l'activité d'une nouvelle protéine s'effectue en milieu homogène et les méthodes biochimiques sont privilégiées. Cependant l'étude de cette protéine une fois immobilisée sur une surface peut également fournir des informations intéressantes. L'électrochimie peut s'avérer être une méthode de caractérisation intéressante. C'est dans ce contexte que cette étude a été réalisée.

L'objectif à terme est d'utiliser les électrodes modifiées par la Fpg pour concevoir un biocapteur impédancemétrique pour la détection des lésions de l'ADN du type 8-oxoguanine. La présence de 8-oxoguanine peut servir de biomarqueur dans l'étude de stress oxydant et de maladies associées comme le cancer^[13,14]. Les techniques les plus courantes sont basées sur des techniques coûteuses ou basés sur un processus multi-étape particulièrement long, tels que des techniques chromatographiques couplés à la spectroscopie de masse^[15] ou la fluorescence^[16–19]. Une détection électrochimique peut ainsi fournir une méthode simple à mettre en œuvre et peu coûteuse. L'équipe de J. Rusling a en particulier mis en œuvre des techniques électrochimiques simples de détection d'ADN endommagées grâce à des électrodes modifiées par des complexes d'osmium et de ruthénium et une transduction basé sur l'ECL^[20] ou sur la voltampérométrie à ondes carrées^[21]. Une technique photoélectrochimique utilisant des complexes de ruthénium capables d'intercaler l'ADN double-brin (voir chapitre 3) a également pu être mis en œuvre pour détecter des oligonucléotides endommagés.^[22]

Pour immobiliser la Fpg, nous avons utilisé le polymère électrogénéré de pyrrole-NTA (acide nitrilotriacétique). Ce monomère est utilisé depuis plusieurs années au sein du laboratoire pour immobiliser des protéines^[23], des brins d'ADN^[24] ou des aptamères^[25] dans le but de réaliser des biocapteurs. Le motif NTA permet *via* l'ion cuivrique de fixer toute biomolécule possédant une étiquette histidine. La première étape est l'électrogénération d'un film de poly-(pyrrole-NTA) sur électrode, suivi par la complexation des ions Cu^{2+} . Ensuite, la

biomolécule sonde modifiée par l'étiquette histidine est immobilisée par coordination des groupes histidine sur le complexe NTA-Cu²⁺ (Figure 28). La détection de la cible en solution est alors possible sur cette électrode modifiée par la sonde biologique.

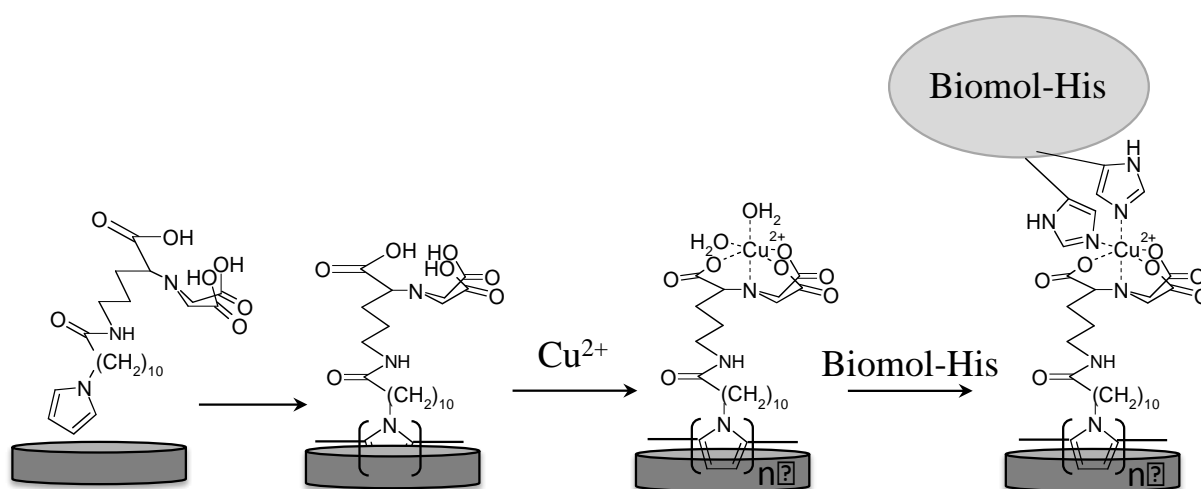


Figure 28. Principe de la fonctionnalisation d'une électrode par une biomolécule via le poly-(pyrrole-NTA)/Cu²⁺

Ce projet a tout d'abord été confié à Charlotte Zborowski en stage de M1 au printemps 2013 sous la direction de Chantal Gondran et Karine Gorgy.

4. Techniques utilisées

Pour étudier l'interaction de la protéine Fpg avec un double-brin d'ADN, deux méthodes ont été utilisées : la Spectroscopie d'Impédance Electrochimique (SIE) et la Résonance des Plasmons de Surface (SPR). Ces deux techniques sont décrites ci-après.

a. Spectroscopie d'impédance électrochimique (SIE)

La spectroscopie d'impédance électrochimique (SIE) est une technique de caractérisation des propriétés électriques et diélectriques des matériaux et des interfaces.

Pour réaliser la mesure d'impédance, une perturbation sinusoïdale (courant ou tension) est appliquée à l'interface électrode / électrolyte (Figure 29).

Cette perturbation du système peut être définie par les grandeurs $E(t)$ et $I(t)$ exprimées en fonction du temps t et de ω , une pulsation caractérisée par $2\pi f$ avec f la fréquence, dont les formules sont données par l'Équation 1 et l'Équation 2

$$\text{Équation 1} \quad E(t) = E_c + \Delta E \sin(\omega t)$$

Équation 2

$$I t = I_c + \Delta I t = I \sin(\omega t + \varphi)$$

Où E_c , la valeur du potentiel de consigne, ΔE : l'amplitude du potentiel alternatif surimposé à E_c , I_c : la valeur du courant continu résultant de la consigne, ΔI : l'amplitude du courant alternatif et φ : le déphasage entre la tension et le courant alternatifs.

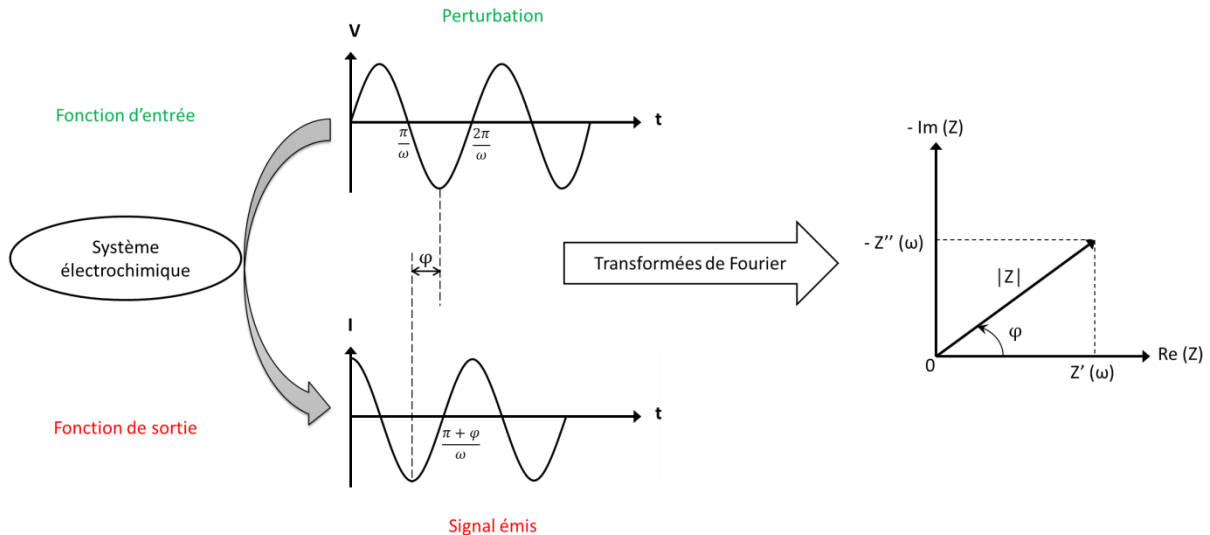


Figure 29. Principe de la mesure d'impédance d'un système électrochimique : une tension et un courant dépendant du temps. Ces deux fonctions peuvent être exprimées en fonction d'une pulsation ω . φ représente le déphasage entre la tension et le courant.

La relation entre les propriétés du système et la réponse due à la perturbation est très complexe à résoudre dans le domaine temporel. Afin de simplifier la réponse du système, suite à l'application de cette tension ou de ce courant sinusoïdale de pulsation ω , les transformées de Fourier sont utilisées comme traitement mathématique. Il en résulte un nombre complexe Z dépendant de cette pulsation ω noté $Z(\omega)$, traduisant l'impédance du système lorsque celui-ci est traversé par un flux d'électron à une fréquence f . Donc l'impédance $Z(\omega)$ est définie comme le rapport entre la tension sinusoïdale appliquée au système et le courant résultant (Équation 3).

Équation 3

$$Z \omega = \frac{\Delta E \omega}{\Delta I \omega}$$

On remarque que cette équation ressemble à la loi d'Ohm ($R = E/I$). La différence entre la loi de l'Équation 3 et la loi d'Ohm est cependant importante puisque grâce à l'impédance on a accès à la partie électrique (Résistances) et à la partie diélectrique (Capacités) du système. Le terme spectroscopie fait référence au fait que l'impédance est déterminée à différentes

fréquences. L'impédance $Z(\omega)$, étant un nombre complexe, il peut également s'écrire sous les formes suivantes qui sont équivalentes (Équation 4).

$$\text{Équation 4} \quad Z(\omega) = |Z| e^{j\varphi} \quad Z(\omega) = |Z'(\omega)| + j |Z''(\omega)| \quad \text{avec } j = \sqrt{-1}$$

$|Z|$ étant le module de l'impédance, φ le déphasage, Z' ou $\text{Re}(Z)$ la partie réelle, Z'' ou $\text{Im}(Z)$ la partie imaginaire et j un nombre imaginaire indiquant une rotation de $\pi/2$ dans le sens antihoraire par rapport à l'axe des abscisses.

Le choix du potentiel (ou du courant) est déterminant pour réaliser la mesure dans de bonnes conditions. En effet, en SIE, la réponse du système étudié suite à une perturbation en potentiel ou en courant doit être linéaire. Mais en électrochimie, les systèmes sont rarement linéaires, il faut donc s'assurer que l'amplitude de la perturbation sinusoïdale, ΔI ou ΔE , soit suffisamment faible pour que la fonction $I = f(E)$ ou $E = f(I)$ soit linéaire dans le domaine perturbé. Le concept d'impédance est défini uniquement si ces conditions sont remplies (Figure 30).

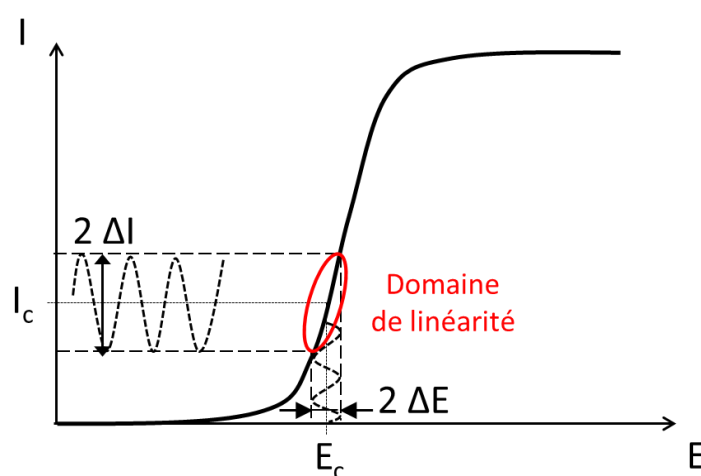


Figure 30. Courbe de courant-tension stationnaire d'un système électrochimique non linéaire soumis à une perturbation sinusoïdale en potentiel et dont la réponse sinusoïdale en courant se trouve sur la partie linéaire de la courbe courant-tension.

Ainsi, en mode potentiostatique, ΔE est l'amplitude de la perturbation sinusoïdale imposée à un potentiel choisi E_c à différentes fréquences, et ΔI l'amplitude de la réponse enregistrée correspondant au courant du système étudié autour de la valeur I_c . En mode galvanostatique, une perturbation en courant de faible amplitude est appliquée au système et c'est la réponse en potentiel qui est enregistrée.

- Représentation de Nyquist des électrochimistes

Les données expérimentales obtenues peuvent être tracées selon deux représentations : la représentation de Nyquist des électrochimistes (Figure 31A) ou de Bode (Figure 31B).

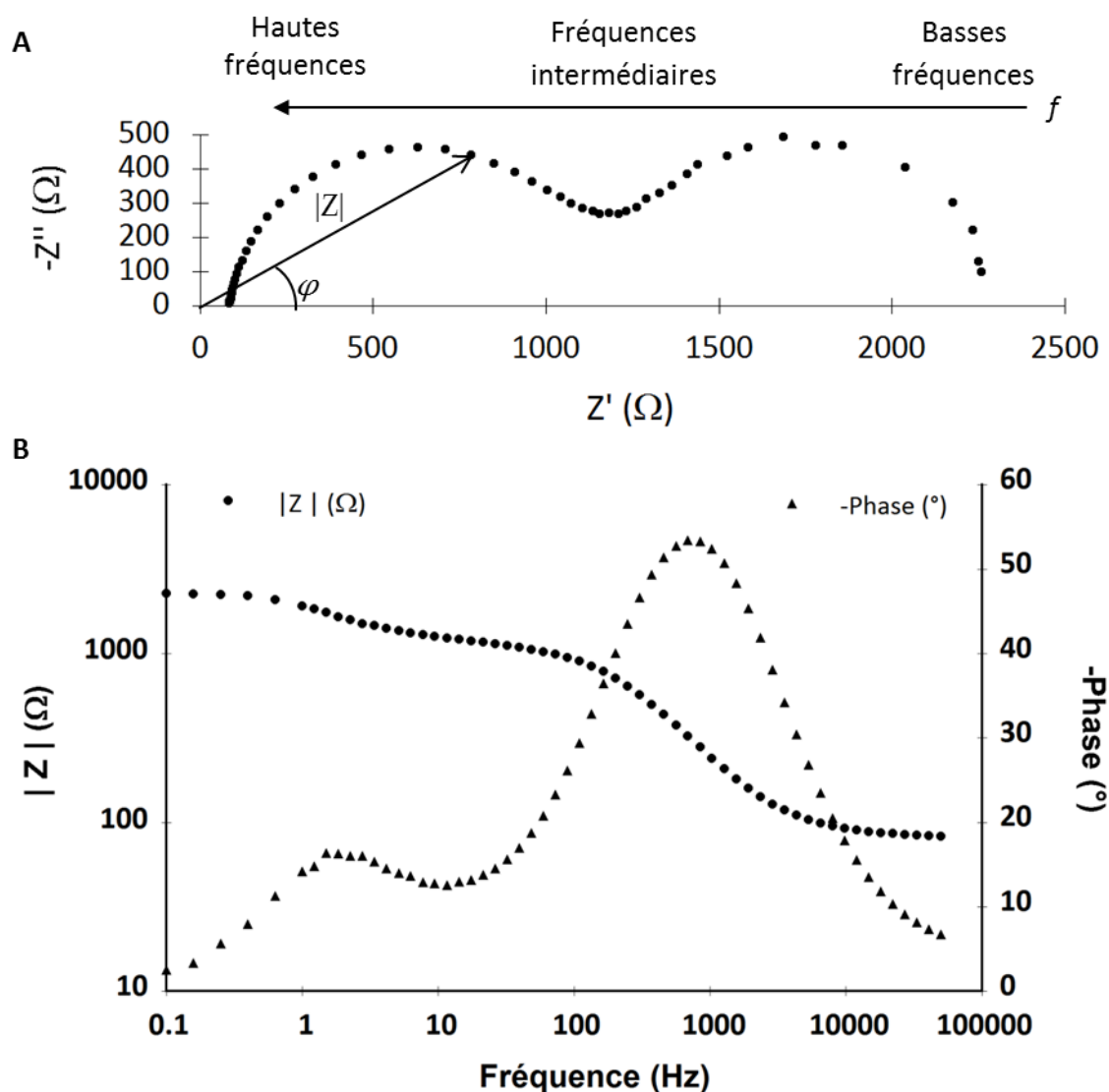


Figure 31. Exemples de diagrammes de (A). Nyquist et (B). Bode. Ces mesures sont obtenues pour une électrode de carbone vitreux fonctionnalisée avec un film de poly(pyrrole-NTA). Sonde redox : hydroquinone 2 mmol.L^{-1} dans du tampon phosphate 50 mmol.L^{-1} pH7 + 100 mmol.L^{-1} NaCl, fréquences 50 kHz à 0.1 Hz, $E_c = 0,325 \text{ V vs. Ag/AgCl saturée en KCl}$, $\Delta E = 10 \text{ mV}_{\text{RMS}}$, $\Omega = 1\,000 \text{ tour.min}^{-1}$, température ambiante.

Dans la représentation de Bode, le logarithme du module d'impédance $|Z|$ et le déphasage φ sont tracés en fonction du logarithme de la fréquence f .

Le diagramme de Nyquist des électrochimistes, également appelé spectre d'impédance, doit être absolument tracé dans un repère orthonormé afin d'obtenir des diagrammes interprétables et non-déformés. Ce spectre d'impédance représente l'opposé de la partie

imaginaire $-Z''$ en fonction de la partie réelle Z' . Chaque point du diagramme correspond aux valeurs des composantes réelle et imaginaire de l'impédance Z (extrémité du vecteur de l'impédance Z , à une fréquence donnée).

Les représentations de Nyquist et de Bode fournissent des informations complémentaires. La représentation de Nyquist permet de voir les différents phénomènes situés à l'interface électrode / électrolyte alors que la représentation de Bode offre une vision complète du domaine de fréquence utilisé.

- Le choix du circuit électrique équivalent

Afin d'élaborer un circuit électrique fidèle aux phénomènes physico-chimiques ayant lieu, le choix des composants électriques intervenant ainsi que leur positionnement est déterminant. Ce circuit est ensuite utilisé pour ajuster les diagrammes expérimentaux afin d'extraire les paramètres nécessaires à la compréhension du système étudié.

Dans le cas d'une électrode plane mise en contact avec un électrolyte, le circuit électrique équivalent émis par Randles est le plus fréquemment utilisé par les électrochimistes (Figure 32). Ce modèle fournit une simulation efficace des réactions de transfert de charge et de diffusion des espèces électroactives qui ont lieu à l'électrode, permettant ainsi de relier les phénomènes physico-chimiques se déroulant aux différentes interfaces.^[26]

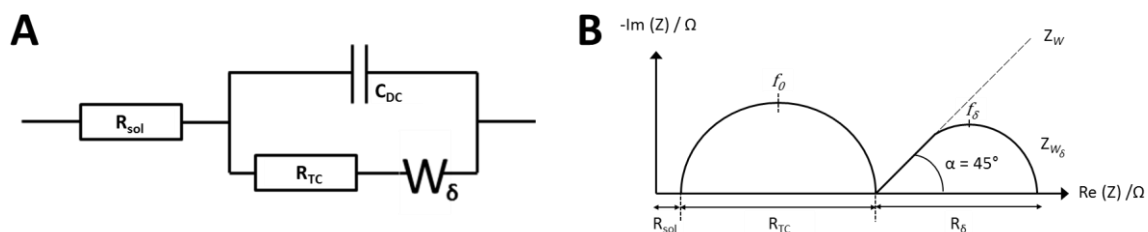


Figure 32. (A). Circuit électrique équivalent de Randles caractérisant une électrode de travail en contact avec une solution. R_{sol} : résistance de l'électrolyte, R_{TC} : résistance de transfert de charge, R_δ : résistance induite par la diffusion des espèces électroactives, α_δ : angle de Warburg, C_{DC} : capacité de double-couche **(B).** Représentation schématisée de l'impédance de Randles par le diagramme de Nyquist dans le cas d'une impédance de Warburg semi-infinie (Z_W) ou d'une impédance de Warburg limitée ($Z_{W\delta}$)

Le circuit équivalent de Randles est composé de quatre éléments qui sont détaillés ci-après.

- **La résistance de l'électrolyte : R_{sol}**

La résistance de l'électrolyte R_{sol} entre l'électrode de travail et l'électrode de référence est une composante qui traduit la conduction ionique dans l'électrolyte et dans le film situé à l'interface électrode / solutions. Elle est dépendante du type d'électrolyte, de la force ionique, de la température et de la surface géométrique de l'électrode. Son impédance Z est notée, $Z_{R_{sol}}$. L'impédance de la résistance ionique est donnée par l'Équation 5.

Équation 5
$$Z_{R_{sol}} \omega = R_{sol}$$

- **La résistance de transfert de charge (R_{TC})**

La résistance de transfert R_{TC} , correspond au flux de courant produit lors des réactions d'oxydo-réduction ayant lieu à l'interface électrode / solution. Elle symbolise le transfert d'électron entre une espèce électroactive en solution et l'électrode. L'impédance de la résistance de transfert de charge est donnée par l'Équation 6.

Équation 6
$$Z_{R_{TC}} \omega = R_{TC}$$

- **La capacité de double-couche (C_{DC})**

La capacité de double couche notée C_{DC} (exprimée en F ou $F.cm^{-2}$) est composée d'une couche compacte et d'une couche diffuse. Elle représente la charge globale stockée à l'interface électrode/solution qui est une zone de séparation de charge. Elle se forme par la charge naturelle du matériau d'électrode qui induit une accumulation des ions à la surface de l'électrode. L'impédance de la capacité de double-couche est donnée par l'Équation 14.

Équation 7
$$Z_{C_{DC}} \omega = \frac{1}{j \omega C}$$

Où $j = \sqrt{-1}$ et ω représente la pulsation.

- **L'impédance de Warburg (W ou W_δ)**

L'impédance de Warburg W fait partie du circuit de Randles afin de prendre en compte la diffusion des espèces électroactives diffusant à travers un matériau (film sur électrode et/ou solution). La diffusion à l'intérieur du film de polymère et de la solution s'effectue à basse fréquence. Cette impédance est ajoutée dans le circuit électrique en série avec la résistance de transfert de charge (branche faradique) et en parallèle avec la capacité de double-couche.

Selon que la diffusion soit semi-infinie (naturelle) ou dans une couche de diffusion δ constante (électrode à disque tournant), deux impédances de Warburg sont distinguées qui sont notées respectivement W et W_δ .

Si la diffusion s'effectue dans une couche semi-infinie c'est à dire en l'absence de convection, le diagramme de Nyquist est composée uniquement d'une droite formant un angle de 45° avec l'axe des réels comme représenté Figure 32B.

Lors de l'utilisation d'électrodes à disque tournant ou de membranes perméables, la couche de diffusion δ est connue et fixe. On parle dans ce cas d'une diffusion dans une couche finie ou limitée. Le diagramme de Nyquist obtenu commence à haute fréquence par une pente à 45° qui se prolonge à basse fréquence par une boucle coupant l'axe des réels en R_δ .

Dans le cas d'un Warburg limité, l'impédance est exprimée par l'Équation 15.

$$\text{Équation 8} \quad Z_{W_\delta}(\omega) = R_\delta \frac{\tanh \frac{j\omega\delta^2}{D}}{\frac{j\omega\delta^2}{D}}$$

De plus, il est possible de calculer la constante de temps caractéristique du phénomène de diffusion τ_δ (Équation 16). L'épaisseur de la couche de diffusion δ sera connue si l'on connaît la valeur du coefficient de diffusion D .

$$\text{Équation 9} \quad \tau_\delta = \frac{2,54}{2\pi f_\delta} = \frac{\delta^2}{D}$$

Avec f_δ (exprimée en Hertz, Hz) correspondant à la fréquence du point se trouvant au sommet du second demi-cercle, δ l'épaisseur de la couche de diffusion, et D , le coefficient de diffusion ($\text{cm}^2 \text{s}^{-1}$).

Dans notre cas, les mesures ont été réalisées avec une électrode à disque tournant, fixant l'épaisseur de la couche de diffusion. La Figure 33 récapitule les différents paramètres pouvant être extrait du diagramme de Nyquist après ajustement des valeurs expérimentales par le circuit électrique de Randles. Ainsi, lors d'une réaction redox sur une électrode, le courant mesuré est la somme d'un courant faradique lié au transfert électronique et au

transport de matière par diffusion et d'un courant capacitif lié à la charge de la double couche. Dans le circuit de Randles, ces phénomènes simultanés sont traduits par la résistance de transfert de charge (R_{TC}) et la capacité de double couche (C_{DC}) associées en parallèle. Pour le transport de matière par diffusion dans une couche δ , une impédance de Warburg est ajoutée à la contribution faradique. La résistance de l'électrolyte R_{sol} est branchée en série à cette connexion parallèle. [27]

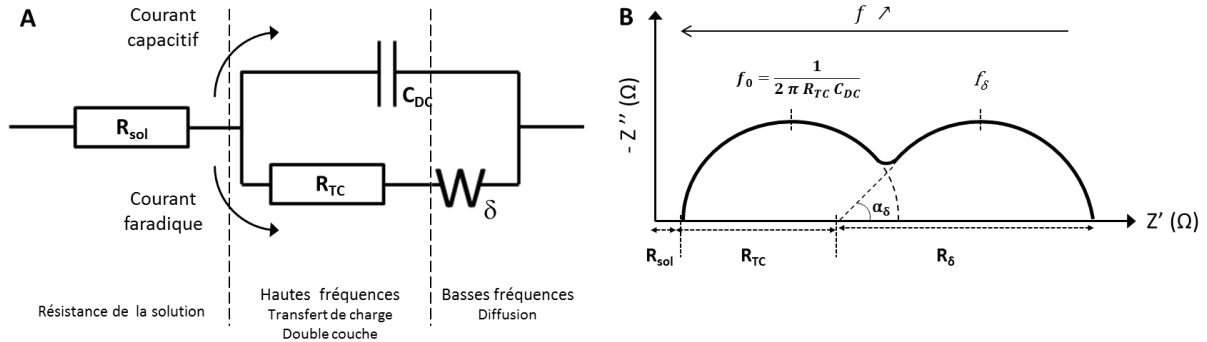


Figure 33. (A). Circuit équivalent de Randles et (B). Représentation schématique de l'impédance de Randles par le diagramme de Nyquist dans le cas d'une électrode tournante (impédance de Warburg limitée). R_{sol} : résistance de l'électrolyte, R_{TC} : résistance de transfert de charge, R_δ : résistance induite par la diffusion des espèces électroactives, α_δ : angle de Warburg, C_{DC} : capacité de double-couche

La capacité de double couche C_{DC} (exprimé en Farad, F) peut être calculée à partir de la fréquence f_0 (Hertz, Hz) correspondant au minimum de la partie imaginaire du demi-cercle haute fréquence. Cette valeur est une caractéristique de l'interface électrode / électrolyte. La relation entre R_{TC} , f_0 et C_{DC} est donnée par l'Équation 18. [28]

$$\text{Équation 10} \quad \omega_0 = 2\pi f_0 = \frac{1}{R_{TC} C_{DC}} \quad \text{avec} \quad R_{TC} C_{DC} = \tau$$

τ représente la constante de temps du processus électrochimique.

- Ajustement du circuit équivalent aux données expérimentales : L'élément à Phase Constante (CPE - Constant Phase Element)

La capacité de double-couche a été remplacée par un élément à phase constante (CPE) lors de l'ajustement des valeurs expérimentales par le circuit électrique équivalent afin de rendre compte de l'inhomogénéité des surfaces et des interfaces. L'impédance du CPE est donnée par l'Équation 19.

Équation 11
$$Z_{CPE} = Q^{-1} j \omega^{-n}$$

Où Q est l'amplitude du CPE, ω la pulsation et n l'exposant compris entre 0 et 1.

Quand $n = 1$, l'impédance du CPE est équivalente à une capacité pure. La valeur de n permet d'estimer l'inhomogénéité des surfaces et des interfaces. Plus la valeur de n s'éloigne de 1, plus l'inhomogénéité est forte. L'analyse des données expérimentales a été réalisée avec le logiciel Z-View (Scribner Associates Inc.).

b. La résonance des plasmons de surface (SPR)

La Résonance des Plasmons de Surface est une technique optique qui repose sur les propriétés des ondes électromagnétiques de surface. Cette technique ne nécessite aucun marquage. Elle permet des mesures d'interaction en temps réel et est très sensible. En effet, toutes variations de masse, d'indice de réfraction et d'épaisseur à la surface de l'électrode induit un changement des ondes électromagnétiques.

Cette technique permet d'étudier l'interaction anticorps-antigène,^{[29][30]} ADN-ADN, interaction protéine-protéine, protéine-sucres,^[31] protéine-ADN ...

Les mesures de SPR sont effectuées sur un support en verre recouvert d'un métal. Les plasmons également appelés polaritons de plasmon de surface ou onde de plasma de surface,^[32] sont des oscillations collectives du nuage d'électrons du métal. Ces plasmons peuvent être excités aussi bien dans le tampon (face diélectrique) qu'à la surface du métal. Ainsi des ondes électromagnétiques se propagent de façon perpendiculaire le long de cette interface métal/diélectrique, à une certaine fréquence (Figure 34A). L'or et l'argent sont les deux principaux métaux qui peuvent supporter les plasmons de surface. Lorsque ce nuage électronique est excité par un faisceau lumineux, la lumière rentre en résonance avec les plasmons de surface. L'onde résultante de ce phénomène est une onde évanescente dont l'amplitude diminue exponentiellement dans la direction perpendiculaire de part et d'autre de l'interface (Figure 34B). L'onde des plasmons de surface se propage dans les directions des axes x et y le long de l'interface métal-diélectrique et l'onde évanescente décroît selon l'axe des z.

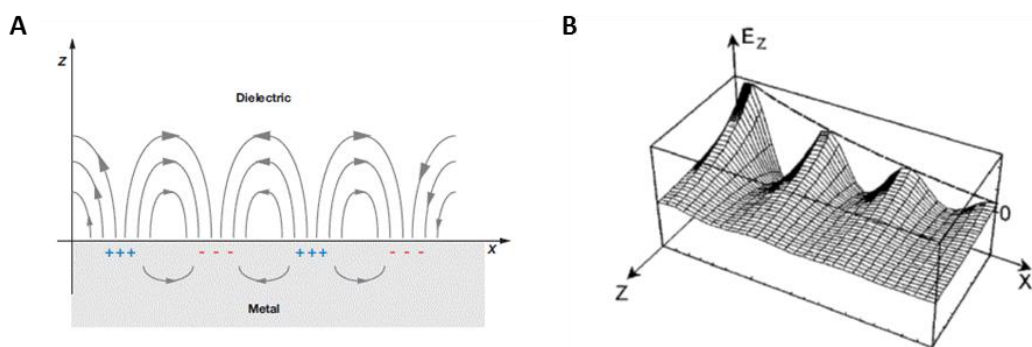


Figure 34. (A). Propagation des oscillations des densités de charge (d'après la référence ^[33]). (B). Représentation des ondes évanescentes à l'interface diélectrique / métal.

Dans le cadre de cette étude, les mesures de résonance plasmonique de surface ont été réalisées avec un SPR Springle (société KE Instrument, Pays-Bas), simple canal permettant des mesures à la fois optiques et électrochimiques. Cet appareil se base sur la configuration de Kretschmann^[34], dont le principe est présenté Figure 35.

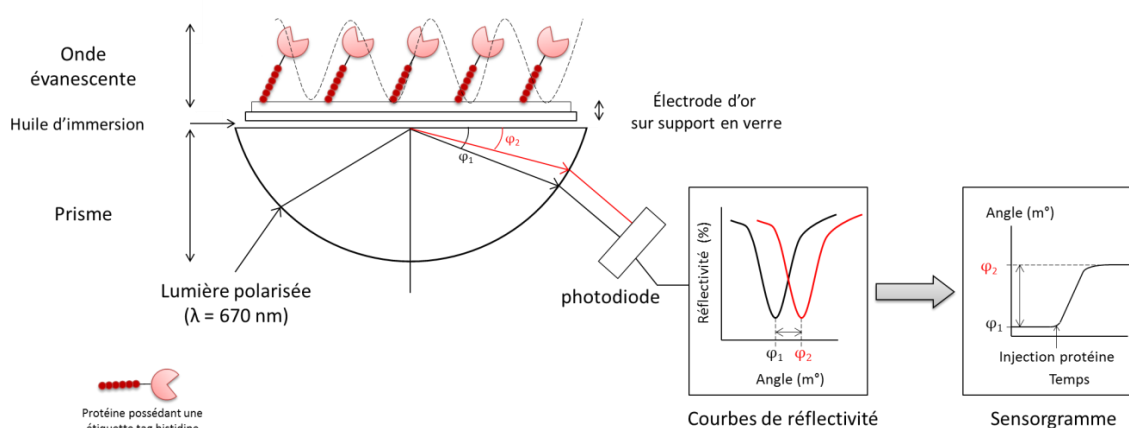


Figure 35. Principe de fonctionnement de la mesure SPR selon la configuration de Kretschmann

La mesure est réalisée sur une électrode d'or déposée sur un support en verre. Le contact entre l'électrode d'or et l'hémicylindre, qui sert de prisme, se fait par une huile d'immersion, de même indice de réfraction que le support en verre et le prisme. Ce SPR possède trois types de prisme : BK-7, BAF-3 et SF-15 à choisir selon l'indice de réfraction des solutions utilisées lors des expérimentations. Ces valeurs sont indiquées dans le Tableau 2.

Tableau 2. Valeurs des indices de réfraction compatibles avec les différents prismes

Référence du prisme	BK-7	BAF-3	SF-15
Indices des solutions	1,26 – 1,38	1,32 – 1,44	1,42 – 1,52

Après avoir introduit le tampon de mesure, une lumière polarisée ($\lambda = 670 \text{ nm}$) est dirigée en direction de l'électrode d'or à travers le prisme. (L'angle d'incidence est fixe et vibre à une fréquence de 76 Hz). Le faisceau lumineux va être reflété avec un angle φ_1 , correspondant à l'électrode d'or, et détectée par une photodiode. En traçant, l'intensité de la lumière en fonction de l'angle d'incidence φ , on obtient la courbe caractéristique d'un angle SPR, appelé courbe de réflectivité. L'angle φ_1 correspond à l'angle où l'intensité de la réflexion totale est minimale. Cet angle est caractéristique de l'état de la surface. Il est sensible à la variation de masse, d'épaisseur et du changement d'indice de réfraction. Par exemple, lors de l'injection d'une protéine, l'indice de réfraction près de la surface et l'épaisseur du dépôt sur la surface d'or vont changer ce qui provoque la diminution de l'angle. Cette diminution d'angle se matérialise par un déplacement de l'angle sur la courbe de réflectivité. L'angle φ_2 traduit l'immobilisation de la protéine avec la surface de l'électrode d'or.

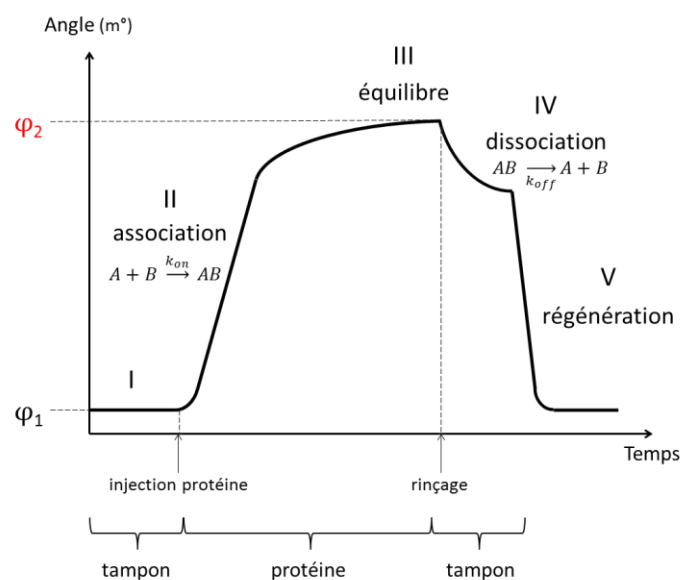
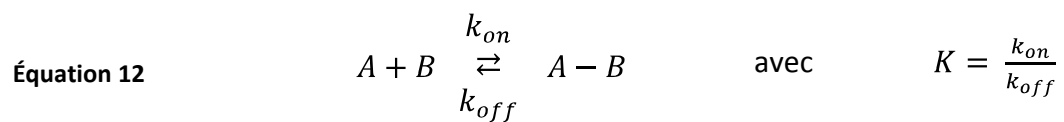


Figure 36. Réponse d'un capteur lors d'une mesure SPR

Les courbes de réflectivité permettent le suivi de l'angle φ lors de chaque modification de la surface. Mais ce graphe ne donne aucune indication d'ordre cinétique. C'est pourquoi un sensorgramme est tracé, permettant de suivre le changement de l'angle φ en temps réel (Figure 36). Un sensorgramme est composé de plusieurs parties permettant de distinguer les phénomènes d'adsorption et de désorption suite au changement d'indice de réfraction à la surface de l'électrode. La partie I du sensorgramme correspond à l'angle φ_1 suite à la stabilisation du signal en présence du tampon de mesure et est considérée comme la ligne de base. Lors de l'injection de la protéine, on note une diminution de l'angle φ correspond à

l'interaction de la protéine avec la surface. Cette diminution de l'angle φ est traduite par une augmentation du signal sur le sensorgramme (partie II). Puis un équilibre s'établit entre les protéines immobilisées et les protéines en solution (phase III). Une fois cette phase d'équilibre atteinte, les protéines en solution sont éliminées avec un tampon de rinçage (phase IV). Ce rinçage entraîne une diminution de l'angle qui devient φ_2 . La variation d'angle entre φ_1 et φ_2 est en lien direct avec la quantité de protéine présente sur la surface d'or. Lorsqu'il est possible de régénérer la surface de l'électrode (phase V) la ligne de base de départ est retrouvée.

À partir de la modélisation de la phase II et IV, il est possible de déterminer une constante d'équilibre pour la formation du complexe AB (Équation 12). Cette interaction peut être décrite avec l'équation suivante :



II. Caractérisation du pyrrole-NTA et du poly-(pyrrole-NTA)

La caractérisation électrochimique du pyrrole-NTA, sa polymérisation par voie électrochimique puis la caractérisation du poly-(pyrrole-NTA) formé sont trois études successives réalisées avec le même système à trois électrodes : une électrode de travail, une contre-électrode et une électrode de référence. La contre électrode est constituée par une verrerie à double poreux contenant une solution de LiClO_4 (lithium perchlorate) de concentration $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$ dans de l'acétonitrile (CH_3CN) dans laquelle est placée un fil de platine. L'électrode de référence est formée par une verrerie à double poreux dont l'un des compartiments est constitué d'un fil d'argent plongé dans une solution de nitrate d'argent (AgNO_3) de concentration $0,01 \text{ mol.L}^{-1}$ dans du LiClO_4 $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$ / CH_3CN et dans l'autre compartiment se trouve du LiClO_4 $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$ / CH_3CN . Cette électrode de référence sera nommée dans le reste du chapitre : électrode Ag^+/Ag . Deux types d'électrodes de travail ont été utilisés : des électrodes de carbone vitreux pour les mesures de spectroscopie d'impédance électrochimique et des électrodes d'or pour les mesures de SPR (Surface Plasmon Resonance). Le carbone vitreux a été choisi pour l'impédance car ces mesures sont réalisées en présence de la sonde rédox hydroquinone et que le transfert d'électron de l'hydroquinone est plus rapide sur carbone vitreux.

1. Électrochimie du monomère en solution

Le pyrrole-NTA représenté Figure 37A possède un groupement pyrrole représenté en vert qui peut être électropolymérisé de façon contrôlée sur une électrode et un groupement NTA représenté en rouge permettant d'immobiliser des biomolécules possédant une étiquette tag histidine, après complexation du polymère avec des cations métalliques.

La caractérisation du monomère de pyrrole-NTA a été réalisée par voltampérométrie cyclique, dans une solution de lithium perchlorate dans de l'acétonitrile acidifiée avec de l'acide perchlorique (HClO_4), permettant la solubilité du monomère. Sur le voltampérogramme obtenu sur carbone vitreux (Figure 37B), on note la présence d'un pic anodique irréversible à $1,08 \text{ V vs. Ag}^+/\text{Ag}$ correspondant à l'oxydation irréversible du pyrrole.^[35,36] Une courbe similaire a été obtenue sur électrode d'or.

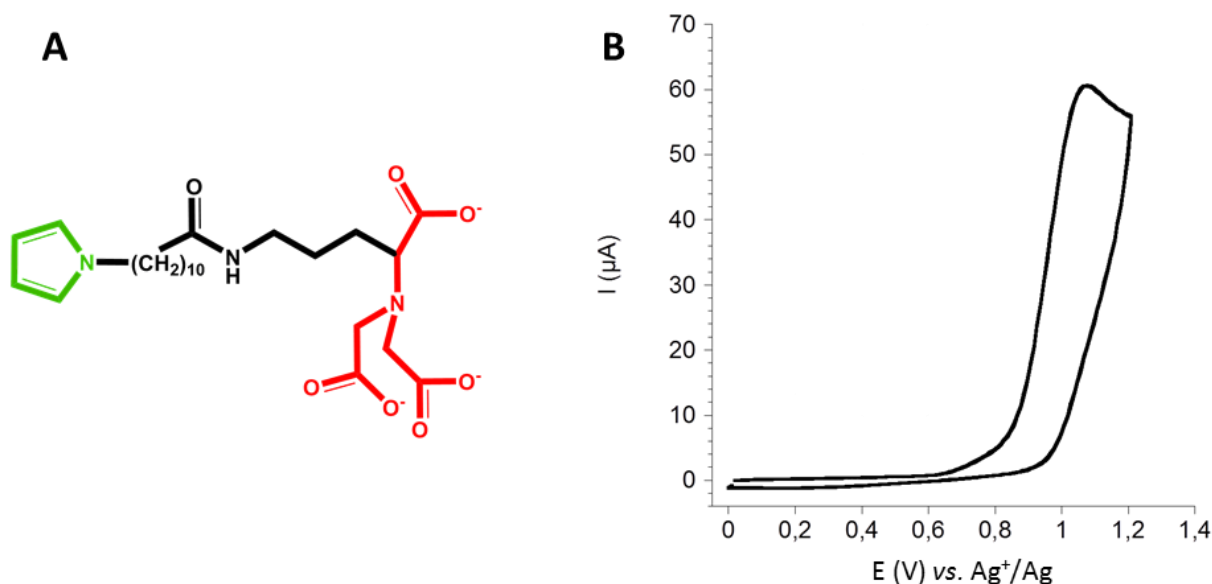


Figure 37. (A). Structure du monomère de pyrrole-NTA, (B). Voltampérogramme d'une solution de monomère pyrrole-NTA (5 mmol.L^{-1}) dans LiClO_4 $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$ / CH_3CN acidifiée avec 3 équivalents de HClO_4 , sur électrode de carbone vitreux ($\varnothing = 3 \text{ mm}$), $v_b = 100 \text{ mV.s}^{-1}$.

2. Électropolymérisation du pyrrole-NTA

La polymérisation s'effectue dans une solution de pyrrole-NTA de concentration 5 mmol.L^{-1} dans une solution de LiClO_4 $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$ / CH_3CN acidifiée avec 3 équivalents de HClO_4 afin de solubiliser le monomère.

Afin de visualiser la formation du polymère sur l'électrode de carbone vitreux, le pyrrole-NTA est électrodéposé par voltampérométrie cyclique. Pour cela, dix balayages successifs entre 0 et $+0,85 \text{ V vs. Ag}^+/\text{Ag}$ sont réalisés (Figure 38A). On note la présence d'un signal réversible centré autour de $0,30 \text{ V vs. Ag}^+/\text{Ag}$ qui augmente au fur et à mesure des scans. Cette augmentation de signal est caractéristique du groupement poly(pyrrole-N-substitué) ^[35,36], traduisant l'augmentation de l'épaisseur du film de polypyrrole à la surface de l'électrode. Après la polymérisation, l'électrode modifiée avec le poly(pyrrole-NTA) est transférée dans une solution de LiClO_4 $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$ / CH_3CN exempte de monomère pour être caractérisée par voltampérométrie cyclique (Figure 38B). On remarque la conservation du signal électrochimique du poly(pyrrole-NTA), indiquant la présence d'un film solidement accroché à la surface de l'électrode de carbone vitreux.

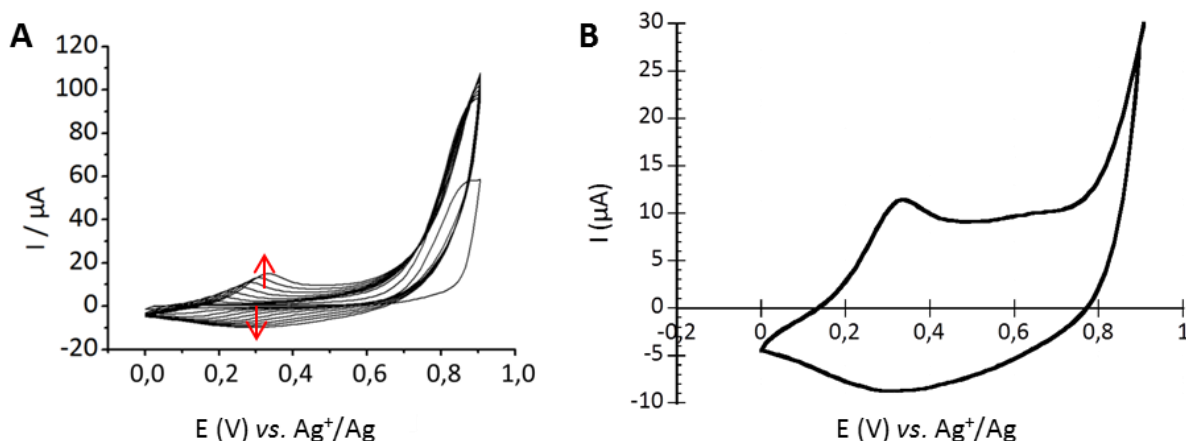


Figure 38. (A). Courbe $I = f(E)$ lors de la polymérisation du pyrrole-NTA (5 mmol.L^{-1}) dans une solution de LiClO_4 $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$ / CH_3CN acidifiée avec 3 équivalents de HClO_4 , sur électrode de carbone vitreux ($\varnothing = 3 \text{ mm}$) par voltampérométrie cyclique (10 scans entre 0 et $0,85 \text{ V vs. Ag}^+/\text{Ag}$, $v_b = 100 \text{ mV.s}^{-1}$), (B). Caractérisation par voltampérométrie cyclique de l'électrode de carbone vitreux fonctionnalisée par du poly(pyrrole-NTA) dans une solution de LiClO_4 $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$ / CH_3CN exempte de monomère ; $v_b = 100 \text{ mV.s}^{-1}$.

Afin d'obtenir des films de poly(pyrrole-NTA) d'épaisseur reproductible, par la suite, la polymérisation est effectuée par chronopotentiométrie en appliquant les paramètres suivants : $Q = 2,5 \text{ mC.cm}^{-2}$ et $t = 18 \text{ s}$. Le fait d'imposer la charge électrique consommée permet de contrôler l'épaisseur du polymère.^[24] À la fin de la polymérisation, le potentiel atteint est de $0,83 \text{ V vs. Ag}^+/\text{Ag}$. Ce potentiel se trouve au pied de la vague d'oxydation du pyrrole, évitant ainsi la suroxydation du polymère.

Sur électrode d'or, la polymérisation a également été réalisée par chronopotentiométrie (Figure 39A) en appliquant les paramètres suivants : $2,5 \text{ mC.cm}^{-2}$, $t = 47,5 \text{ s}$ sur une surface de 11 mm de diamètre. À la fin de la polymérisation, le potentiel atteint une valeur de $0,82 \text{ V vs. Ag}^+/\text{Ag}$, identique à ce qui a été obtenu sur carbone vitreux. En transférant l'électrode polymérisée dans une solution de LiClO_4 $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$ / CH_3CN exempte de monomère (Figure 39B), on remarque que le signal électrochimique du poly(pyrrole-NTA) autour de $0,5 \text{ V vs. Ag}^+/\text{Ag}$ est conservé, indiquant la présence d'un film solide à la surface de l'électrode d'or. Le signal est situé plus haut que sur carbone vitreux ($+0,5 \text{ V}$ au lieu de $+0,3 \text{ V vs. Ag}^+/\text{Ag}$).

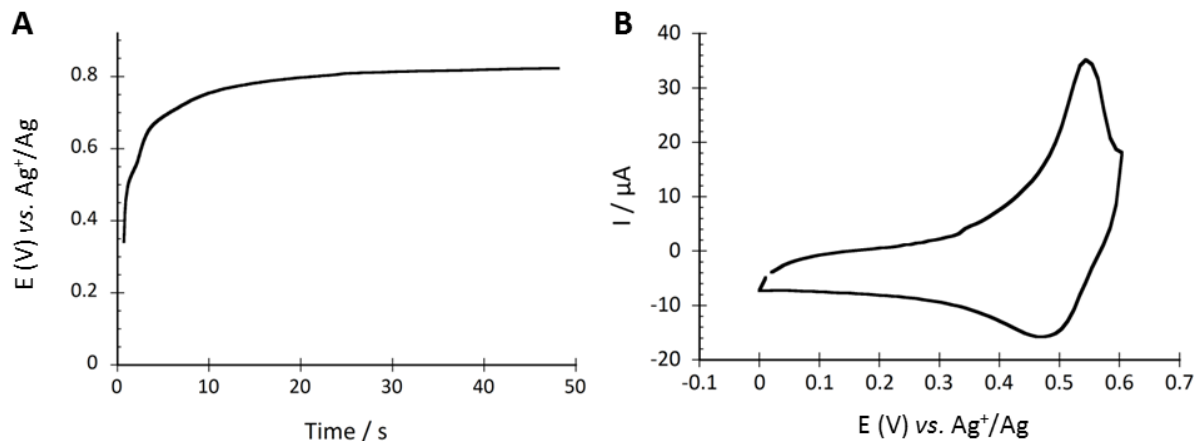


Figure 39. (A). Chronopotentiométrie enregistrée lors de la polymérisation du pyrrole-NTA (5 mmol.L^{-1}) dans une solution de LiClO_4 $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$ / CH_3CN acidifiée avec 3 équivalents de HClO_4 , sur une électrode d'or ($\varnothing = 11 \text{ mm}$) par chronopotentiométrie ($Q = 2,5 \text{ mC.cm}^{-2}$, $t = 47,5 \text{ s}$). (B). Caractérisation par voltampérométrie cyclique du poly-(pyrrole-NTA) dans une solution de LiClO_4 $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$ / CH_3CN exempte de monomère ; $v_b = 100 \text{ mV.s}^{-1}$.

3. Évaluation de la polymérisation du poly(pyrrole-NTA)

À partir des voltampérogrammes obtenus après la polymérisation du pyrrole-NTA par chronopotentiométrie, il est possible de calculer le taux de recouvrement surfacique réel $\Gamma_{\text{réel}}$ de l'électrode, en intégrant le signal du poly-(pyrrole). Ce taux de recouvrement surfacique de l'électrode correspond à la concentration en sites électroactifs par unité de surface et est défini par l'équation suivante :

$$\text{Équation 13} \quad \Gamma_{\text{réel}} = \frac{\frac{Q_{\text{intégrée}}}{2}}{n F S}$$

Où $Q_{\text{intégrée}}$, en coulomb, correspond à la quantité d'électricité intégrée sous le signal du poly-(pyrrole-NTA), n : le nombre d'électrons échangés par le système. Il y a 0,33 électron consommé par motif pyrrole pour l'oxydation du film formé, F : la constante de Faraday (96485 C.mol^{-1}) et S : la surface de l'électrode (cm^2).

Une fois $\Gamma_{\text{réel}}$ déterminé, le taux de recouvrement surfacique théorique de l'électrode $\Gamma_{\text{théorique}}$ est calculé à l'aide de l'équation suivante :

$$\text{Équation 14} \quad \Gamma_{\text{théorique}} = \frac{Q_{\text{polymérisation}}}{n' F S}$$

Où $Q_{\text{polymérisation}}$, en coulomb, correspond à la charge imposée durant la polymérisation, n' : le nombre d'électrons échangés par le système lors de la polymérisation (2,33).

Le rapport entre la quantité d'espèces électroactives immobilisées à la surface de l'électrode $\Gamma_{\text{réel}}$ et la quantité d'espèces immobilisées théoriquement $\Gamma_{\text{théorique}}$ permet de calculer le rendement de polymérisation η (Équation 15).

$$\text{Équation 15} \quad \eta = \frac{\Gamma_{\text{réel}}}{\Gamma_{\text{théorique}}} \times 100$$

Le Tableau 3 regroupe les rendements de polymérisation obtenus pour plusieurs électrodes de carbone vitreux et d'or. Le rendement moyen d'un dépôt de polymère par voie électrochimique est de l'ordre de 19 % sur électrode de carbone vitreux et de 27 % sur électrode d'or. On peut remarquer que le rendement de polymérisation est légèrement plus important sur électrode d'or même s'il reste faible.

Ces faibles valeurs de rendement de polymérisation peuvent s'expliquer par le fait que les films de polypyrrole N-substitués sont moins conducteurs que les films de polypyrrole.^[37]

Tableau 3. Calcul du rendement de polymérisation η après électropolymérisation du pyrrole-NTA sur électrode de carbone vitreux et sur électrode d'or.

	$Q_{\text{polymérisation}}$ (mC)	$\Gamma_{\text{théorique}}$ (mol.cm ⁻²)	$Q_{\text{intégrée}}$ (Coulomb)	$\Gamma_{\text{réel}}$ (mol.cm ⁻²)	η (%)
Carbone vitreux (\varnothing = 3mm)	0,18	$1,13 \times 10^{-08}$	$8,55 \times 10^{-06}$	$1,90 \times 10^{-09}$	17
			$9,96 \times 10^{-06}$	$2,21 \times 10^{-09}$	20
			$1,12 \times 10^{-05}$	$2,48 \times 10^{-09}$	22
			$1,21 \times 10^{-05}$	$2,68 \times 10^{-09}$	24
			$1,68 \times 10^{-05}$	$3,73 \times 10^{-09}$	33
			$7,33 \times 10^{-06}$	$1,63 \times 10^{-09}$	14
			$6,20 \times 10^{-06}$	$1,38 \times 10^{-09}$	12
			$3,45 \times 10^{-06}$	$7,66 \times 10^{-10}$	7
Électrode d'or (\varnothing = 11 mm)	2,38	$1,12 \times 10^{-08}$	$2,30 \times 10^{-04}$	$3,81 \times 10^{-09}$	34
			$1,62 \times 10^{-04}$	$2,68 \times 10^{-09}$	24
			$1,63 \times 10^{-04}$	$2,70 \times 10^{-09}$	24

4. Impédance du film de poly(pyrrole-NTA)

Une fois la polymérisation réalisée, le film de poly(pyrrole-NTA) est caractérisé par spectroscopie d'impédance électrochimique (SIE). Cette méthode va nous permettre de caractériser les différentes étapes de formation du biocapteur.

Pour toutes les mesures réalisées en SIE, l'hydroquinone a été utilisée comme sonde redox. La diffusion de la sonde au sein du polymère permet d'obtenir des informations sur l'encombrement de la surface de l'électrode.

Avant de commencer les mesures d'impédance, le potentiel d'étude est déterminé. Pour cela, un voltampérogramme en régime stationnaire est réalisé (Figure 40) dans une solution d'hydroquinone 2 mmol.L^{-1} .

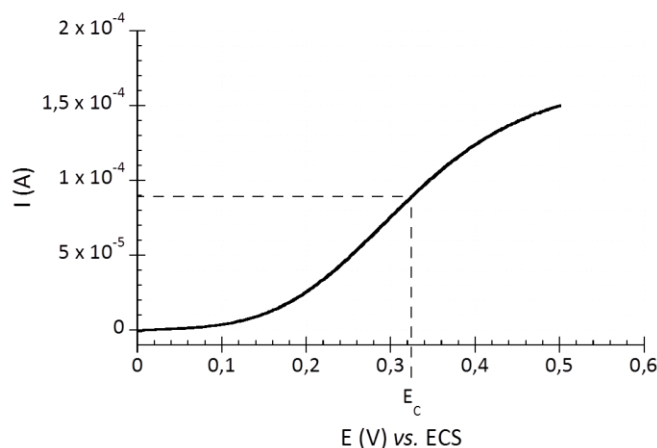


Figure 40. Voltampérogramme en régime stationnaire d'une électrode carbone vitreuse modifiée avec un film de poly(pyrrole-NTA). Le film de poly(pyrrole-NTA) est formé par chronopotentiométrie ($Q = 2,5 \text{ mC.cm}^{-2}$, $t = 18 \text{ s}$), Sonde redox : hydroquinone 2 mmol.L^{-1} dans du tampon phosphate 50 mmol.L^{-1} pH 7 + 100 mmol.L^{-1} NaCl, température ambiante, $v_b = 10 \text{ mV.s}^{-1}$, $\Omega = 1\,000 \text{ tour.min}^{-1}$.

Le potentiel choisi se situe dans la partie linéaire de la courbe $I=f(E)$. Nous avons choisi $E_c = 0,325 \text{ V}$ vs ECS correspondant au potentiel d'oxydation de l'hydroquinone avec une amplitude du signal perturbateur $\Delta E = 10 \text{ mV}_{\text{rms}}$. A ce potentiel, le transfert de charge et la diffusion peuvent être observés sur le spectre d'impédance.

Une fois le potentiel déterminé, des spectres d'impédance sont réalisés sur un film de poly(pyrrole-NTA) avec plusieurs vitesses de rotation de l'électrode : 750, 1 000 et 1 250 tour.min^{-1} (Figure 41). Ces spectres comporteront 54 points entre 50 kHz et 1 Hz et 6 points entre 1 et 0,1 Hz. Ainsi, le domaine de fréquence choisi s'étend de 50 kHz à 0,1 Hz.

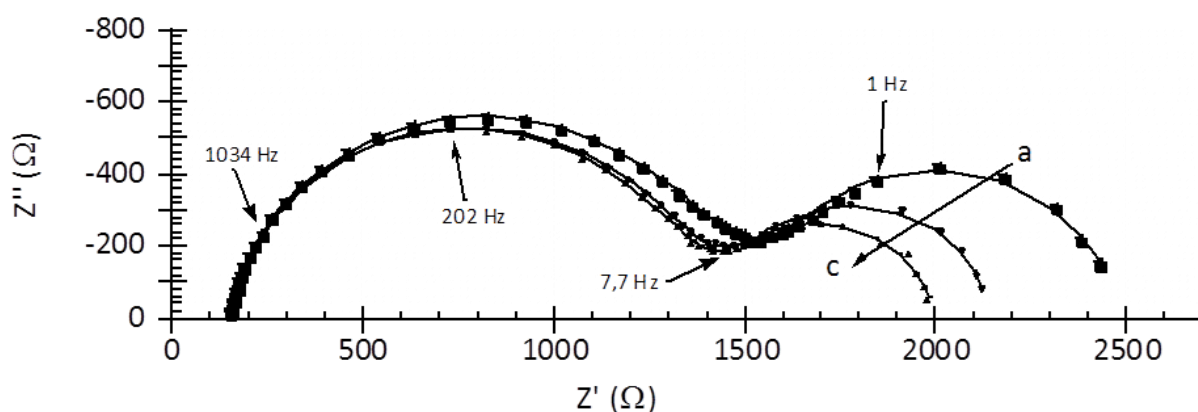


Figure 41. Diagrammes de Nyquist obtenus pour différentes vitesses de rotation d'une électrode tournante de carbone vitreux ($\varnothing = 3$ mm) a. 750, b. 1000, c. 1250 $\text{tour} \cdot \text{min}^{-1}$. Les valeurs expérimentales sont présentées par les points et l'ajustement avec le circuit équivalent par les lignes. Le film de poly-(pyrrole-NTA) est formé par chronocoulométrie ($Q = 2,5 \text{ mC} \cdot \text{cm}^{-2}$, $t = 18 \text{ s}$), Gamme de fréquences 50 kHz à 0,1 Hz, $E_c = 0,325 \text{ V vs. ECS}$, $\Delta E = 10 \text{ mV}_{\text{rms}}$, Sonde redox : hydroquinone $2 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ dans du tampon phosphate $50 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1} \text{ pH} 7 + 100 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1} \text{ NaCl}$, température ambiante.

En ajustant les données expérimentales avec le circuit équivalent de la Figure 33, il est possible de déterminer la part de chaque composante dans le processus électrochimique. Les valeurs sont présentées Tableau 4. Ces valeurs vont être utilisées afin de valider le choix du circuit de Randles utilisé.

Tableau 4. Valeurs issues de l'ajustement des données avec par le circuit équivalent de Randles choisi. R_{sol} : résistance de l'électrolyte, R_{TC} : résistance de transfert de charge, C_{DC} : capacité de double couche, f_0 : fréquence du point se trouvant au sommet du premier demi-cercle, n : exposant CPE caractéristique du décentrage du premier demi-cercle par rapport à l'axe des réels, R_δ : résistance de la diffusion de l'hydroquinone, τ_δ : constante de temps de la diffusion de l'hydroquinone, n_δ : angle de Warburg

Ω ($\text{tour} \cdot \text{min}^{-1}$)	750	1 000	1 250
$R_{\text{sol}}(\Omega)$	155 ± 2	149 ± 2	146 ± 2
$R_{\text{TC}}(\Omega)$	$1\,183 \pm 18$	$1\,173 \pm 18$	$1\,179 \pm 18$
$C_{\text{DC}}(\mu\text{F})$	$0,68 \pm 0,01$	$0,67 \pm 0,01$	$0,66 \pm 0,01$
f^0 (Hz)	198	203	205
n	0,910	0,912	0,913
$R_\delta(\Omega)$	809 ± 12	678 ± 10	562 ± 8
τ_δ (s)	0,48	0,37	0,29
n_δ	0,458	0,452	0,451

En analysant ces valeurs d'ajustement, on remarque que les valeurs de R_{sol} , R_{TC} , C_{DC} , f^0 , n et n_δ ne sont quasiment pas modifiées quelle que soit la vitesse de rotation de l'électrode. Par contre, lorsque la vitesse de rotation de l'électrode augmente, la résistance de diffusion, R_δ

et le temps de transition, τ_δ , diminuent fortement. Ces deux paramètres sont caractéristiques de la seconde boucle avec n_δ . Par conséquent, il semblerait que seule la boucle correspondant à l'impédance de Warburg soit affectée par la vitesse de rotation de l'électrode, celle-ci étant liée à la diffusion des espèces en solution. Ce résultat est parfaitement logique puisque dans cette étude seule la vitesse de rotation de l'électrode a été modifiée. La vitesse de rotation de l'électrode n'affecte pas la vitesse de transfert d'électron par contre elle peut modifier l'épaisseur de la couche de diffusion.

L'Équation 16, ci-dessous, permet de relier la vitesse de rotation de l'électrode Ω à l'épaisseur de la couche de diffusion δ plane en solution.

$$\text{Équation 16} \quad \delta = 1,613 D^{\frac{1}{3}} \nu^{-\frac{1}{6}} \Omega^{-\frac{1}{2}}$$

Où D est le coefficient de diffusion de la sonde redox ($\text{cm}^2.\text{s}^{-1}$), ν la viscosité cinématique de la solution ($\text{cm}^2.\text{s}^{-1}$) et Ω la vitesse de l'électrode ($\text{rad}.\text{s}^{-1}$).

Si la couche de diffusion est située dans la solution, la valeur de δ doit suivre cette loi. Par contre si l'épaisseur de la couche de diffusion est partiellement ou totalement comprise dans le film de polymère, cette loi n'est pas applicable. Afin de vérifier cette hypothèse, en combinant l'Équation 16 et l'Équation 9, la courbe $\tau_\delta^{1/2}$ en fonction de $\Omega^{-1/2}$ est tracée (Figure 42). La droite obtenue montre un R^2 de 0,999.

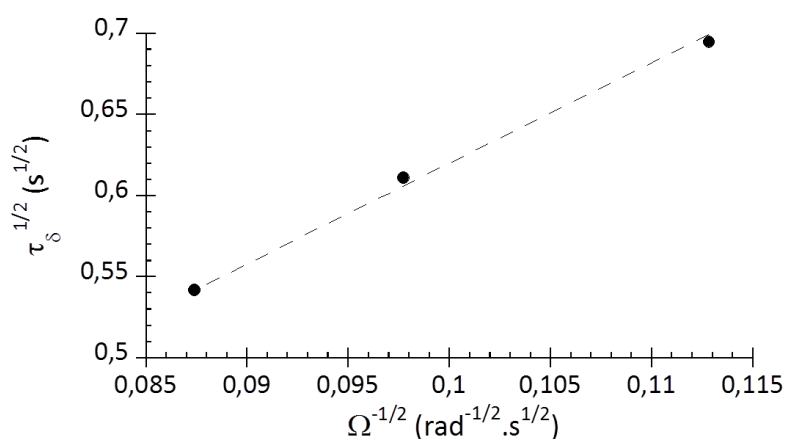


Figure 42. Relation entre la diffusion de l'hydroquinone et la vitesse de rotation de l'électrode tournante

Le résultat étant linéaire, cela signifie que la couche de diffusion est située dans la solution.

La valeur de capacité de double couche obtenue est parfaitement cohérente avec une interface électrode / solution aqueuse qui doit être de l'ordre d'une dizaine de microfarad par centimètre carré.

Cette expérience permet de valider le circuit équivalent choisi puisqu'il démontre que la boucle à basse fréquence est liée à la diffusion et qu'il ne peut pas être confondu avec un demi-cercle correspondant à une résistance en parallèle à une capacité et que l'ordre de grandeur de la capacité de double couche est respecté.

Pour la suite, la vitesse de rotation de l'électrode choisie est de 1 000 rpm. À cette vitesse, la partie haute fréquence est clairement distinguable de la partie basse fréquence.

III. Étude de l'interaction de la protéine Fpg avec un double-brin d'ADN sans lésion par des méthodes électrochimiques

1. Les différentes étapes d'élaboration du biocapteur

Afin de réaliser l'étude de l'interaction de la protéine Fpg avec un double-brin d'ADN, la protéine Fpg est immobilisée à la surface d'une électrode de carbone fonctionnalisée avec un film de poly-(pyrrole-NTA). Pour cela, le film de poly-(pyrrole-NTA) est formé par chronopotentiométrie ($Q = 2,5 \text{ mC.cm}^{-2}$, $t = 18 \text{ s}$). Ensuite, l'électrode est plongée dans une solution de chlorure de cuivre de concentration $10^{-2} \text{ mol.L}^{-1}$ dans du tampon acétate $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$, pH 4,8 pendant 20 minutes, avant d'être rincée pendant 15 minutes sous vive agitation dans une solution de chlorure de sodium de concentration $0,5 \text{ mol.L}^{-1}$. Puis la protéine Fpg est immobilisée sur le film de poly(pyrrole-NTA) *via* les ions cuivre. Pour ce faire 10 μL de Fpg sont incubés à la surface de l'électrode pendant 30 minutes. Puis l'électrode fonctionnalisée est rincée pendant 15 min sous vive agitation dans du tampon phosphate 50 mmol.L^{-1} pH7 contenant 100 mmol.L^{-1} de NaCl.

Pour l'étude de l'interaction de l'ADN avec la protéine Fpg immobilisée, le même volume et temps d'incubation et de rinçage sont utilisés. La Figure 43 reprend les différentes étapes de l'élaboration du système utilisé pour étudier l'interaction entre la protéine Fpg et un double-brin d'ADN.

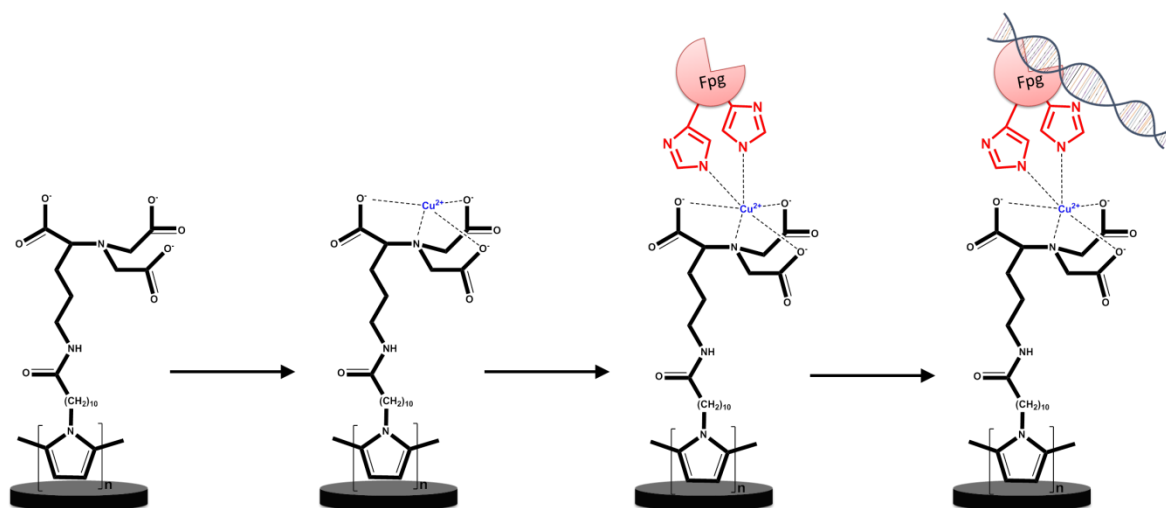


Figure 43. Les différentes étapes d'élaboration du biocapteur. a. électropolymerisation du pyrrole-NTA sur une électrode de carbone vitreux par chronocoulométrie, b. incubation de l'électrode modifiée dans une solution de CuCl_2 , c. Immobilisation de la protéine Fpg possédant un tag histidine *via* les ions cuivre, d. incubation de l'électrode fonctionnalisée avec la Fpg dans une solution d'ADN double-brin.

Comme dit dans l'introduction, pour réaliser ce biocapteur, nous disposons d'une Fpg de *Deinococcus radiodurans* possédant soit une étiquette tag histidine soit du côté N-terminal (Ct-His-Fpg) soit du côté C-terminal (Fpg-His-Nt). Selon la position de l'étiquette tag histidine, il y a un encombrement structural soit au niveau de la proline (domaine N-terminal) impliquée dans la coupure du double-brin d'ADN comportant des lésions soit au niveau du doigt de zinc (domaine C-terminal) impliqué dans la reconnaissance de l'ADN. L'immobilisation sur le film de poly(pyrrole-NTA) de ces deux protéines, puis l'interaction de l'ADN double brin avec la protéine immobilisée est principalement étudiée par spectroscopie d'impédance électrochimique. Quelques mesures de SPR ont aussi été réalisées.

2. Immobilisation des deux protéines Nt-His-Fpg et Fpg-His-Ct sur le poly(pyrrole NTA)

a. Immobilisation de la protéine Nt-His-Fpg

L'étude de la protéine Nt-His-Fpg dont la structure du gène est rappelée Figure 44, s'effectue par spectroscopie d'impédance électrochimique, une fois celle-ci immobilisée sur un film de poly-(pyrrole-NTA).



Figure 44. Structure schématique du gène de la protéine Nt-His-Fpg

Cette étude commence par l'incubation successive d'un film de poly-(pyrrole-NTA) avec six concentrations différentes de Nt-His-Fpg (4×10^{-12} à 4×10^{-5} mol.L⁻¹) afin de visualiser le comportement de la protéine. Les spectres d'impédance obtenus sont présentés Figure 45.

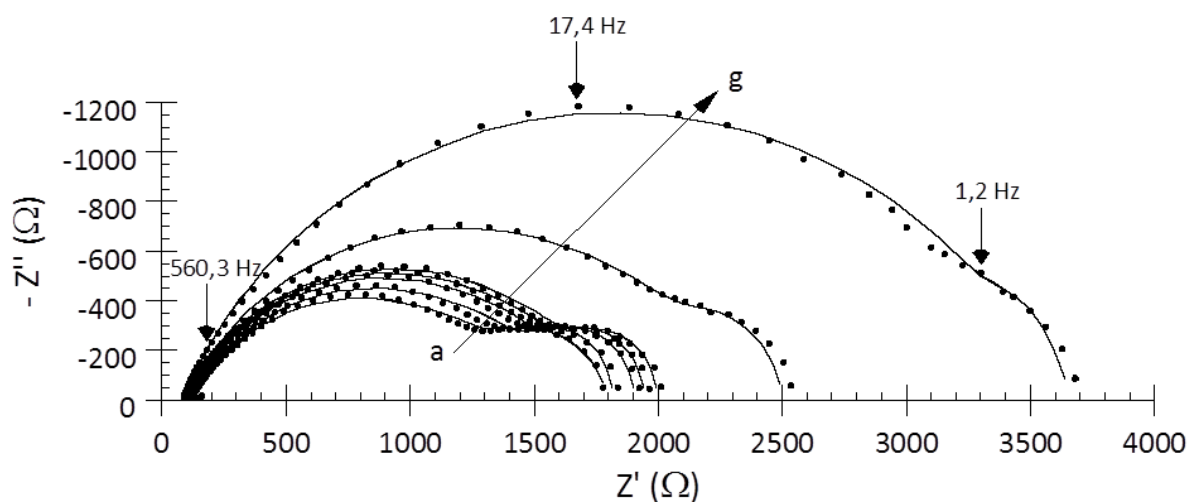


Figure 45. Diagrammes de Nyquist obtenus après incubation du film de poly-(pyrrole-NTA) (a). sans protéines puis avec différentes concentrations de Nt-His-Fpg (b). 4×10^{-12} mol.L⁻¹, (c). 4×10^{-9} mol.L⁻¹, (d). 4×10^{-8} mol.L⁻¹, (e). 4×10^{-7} mol.L⁻¹, (f). 4×10^{-6} mol.L⁻¹, (g). 4×10^{-5} mol.L⁻¹. Les valeurs expérimentales sont représentées par des points et l'ajustement avec le circuit équivalent par des lignes. Le film de poly-(pyrrole-NTA) est formé par chronocoulométrie ($Q = 2,5$ mC.cm⁻², $I = 10$ μA), Gamme de fréquences 50 kHz à 0,1 Hz, $E_c = 0,325$ V vs. ECS, $\Delta E = 10$ mV_{rms}, $\Omega = 1\ 000$ tour.min⁻¹, Sonde redox : hydroquinone 2 mmol.L⁻¹ dans du tampon phosphate 50 mmol.L⁻¹ pH7 + 100 mmol.L⁻¹ NaCl, température ambiante.

Sur la Figure 45, nous remarquons que les spectres d'impédance obtenus sont composés de deux boucles comme attendu. Le spectre d'impédance le plus petit correspond au film poly(pyrrole-NTA), les spectres suivants sont obtenus après incubation des différentes concentrations de Nt-His-Fpg. On remarque que pour des concentrations de Nt-His-Fpg comprises entre 4×10^{-12} et 4×10^{-7} mol.L⁻¹, l'impédance augmente peu par rapport à celle du film de polymère seul. Par contre, lorsque le film de poly-(pyrrole-NTA) est incubé avec une concentration de Nt-His-Fpg de 4×10^{-7} mol.L⁻¹ ; 4×10^{-6} mol.L⁻¹ et 4×10^{-5} mol.L⁻¹, les spectres d'impédance obtenus se différencient facilement de celui obtenu avec le polymère.

Les valeurs issues de l'ajustement des spectres présentés Figure 45, avec le circuit équivalent choisi, sont présentées Tableau 5 pour les trois plus fortes concentrations en Nt-His-Fpg, c'est à dire pour des concentrations qui permettent de recouvrir suffisamment la surface du polymère.

Tableau 5. Valeurs issues de l'ajustement des données avec par le circuit équivalent de Randles choisi. R_{sol} : résistance de l'électrolyte, R_{TC} : résistance de transfert de charge, C_{DC} : capacité de double couche, f^0 : fréquence du point se trouvant au sommet du premier demi-cercle, n : exposant CPE caractéristique du décentrage du premier demi-cercle par rapport à l'axe des réels, R_δ : résistance de la diffusion de l'hydroquinone, τ_δ : constante de temps de la diffusion de l'hydroquinone, n_δ : angle de Warburg

[Nt-His-Fpg] (mol.L ⁻¹)	0	4 X 10 ⁻⁰⁷	4 X 10 ⁻⁰⁶	4 X 10 ⁻⁰⁵
$R_{sol}(\Omega)$	122 ± 2	86 ± 1	87 ± 1	82 ± 1
$R_{TC}(\Omega)$	1 178 ± 19	1 645 ± 25	2 166 ± 32	3 428 ± 51
$C_{DC}(\mu F)$	4,06 ± 0,07	3,16 ± 0,05	3,36 ± 0,05	3,08 ± 0,05
f^0 (Hz)	31	31	22	15
n	0,703	0,720	0,717	0,748
$R_\delta(\Omega)$	400 ± 6	275 ± 4	259 ± 4	260 ± 4
τ_δ (s)	0,42	0,34	0,33	0,36
n_δ	0,515	0,600	0,597	0,700

On notera avant tout que la variation des paramètres de diffusion R_δ , τ_δ et n_δ est peu exploitable. La résistance de diffusion semble diminuer mais les valeurs de n_δ sont trop élevées pour que l'on puisse en déduire quoi que ce soit. Le nombre de points, associé à ce phénomène de diffusion sur le spectre, est trop faible pour ajuster correctement ces paramètres. D'autre part, la variation de la résistance de l'électrolyte R_{sol} n'apporte pas d'information sur l'électrode de travail. Elle est liée au positionnement de l'électrode de travail et de l'électrode de référence dans la cellule. Reste donc, la résistance de transfert de charge R_{TC} , la capacité de double couche C_{DC} , la fréquence associée à ces deux paramètres f^0 et la valeur de n .

Concernant la résistance de transfert de charge R_{TC} , elle augmente progressivement lorsque le film de poly-(pyrrole-NTA) est incubé avec les différentes concentrations de protéine Nt-His-Fpg. Cette augmentation est de 467 Ω pour la concentration 4 x 10⁻⁰⁷ mol.L⁻¹, de 988 Ω pour 4 x 10⁻⁰⁶ mol.L⁻¹ et de 2250 Ω pour 4 x 10⁻⁰⁵ mol.L⁻¹. Ceci montre que le transfert

d'électron de la sonde rédox hydroquinone est ralenti au fur et à mesure que la surface se recouvre de la protéine Nt-His-Fpg. L'encombrement de la surface par la protéine provoque une gêne pour le transfert d'électron lié à l'oxydation de l'hydroquinone. Le taux de recouvrement électrochimique peut être calculé grâce à l'Équation 17.

Équation 17

$$\theta = 1 - \frac{R_{TC}}{R'_{TC}}$$

Où R_{TC} est la résistance de transfert du film seul et R'_{TC} est la résistance de transfert obtenue après immobilisation des différentes concentrations de Nt-His-Fpg.

On trouve un taux de recouvrement électrochimique de 0,28 ; 0,46 et 0,66 respectivement pour les trois concentrations 4×10^{-07} mol.L⁻¹, 4×10^{-06} mol.L⁻¹ et 4×10^{-05} mol.L⁻¹ en Nt-His-Fpg. Ce qui veut dire, par exemple pour la dernière concentration, que 66% du transfert d'électron n'est plus possible à cause de la gêne stérique rajoutée par la présence de la protéine Nt-His-Fpg sur la surface. C'est comme si 66% de la surface de l'électrode était passivée par la protéine.

La valeur de la capacité de double-couche C_{DC} et la fréquence au sommet du demi-cercle de fréquence intermédiaire diminuent. Ces deux paramètres démontrent respectivement que l'encombrement rajouté par la présence de la protéine Nt-His-Fpg sur la surface modifie le facteur géométrique du condensateur et ralenti le transfert d'électron.

L'exposant du CPE, n , caractéristique du décentrage du premier demi-cercle a tendance à augmenter légèrement. Cela signifie que l'immobilisation de la protéine sur la surface du film ne change pas foncièrement la rugosité du film même si la présence de la protéine a tendance à aplanir légèrement la surface en bouchant quelques creux.

En conclusion, le demi-cercle pour les fréquences intermédiaires est celui qui est le plus impacté par la présence de la protéine Nt-His-Fpg.

L'immobilisation de la protéine Ct-His-Fpg, a aussi été vérifiée par mesure de SPR sur or. Nous avons dû diminuer les concentrations de protéines pour avoir des signaux exploitables. En effet, au-dessus d'une variation d'angle de 600m°, la réponse n'est plus linéaire avec la variation d'épaisseur de protéine sur la surface. La concentration de Nt-His-

Fpg utilisées est de $2 \mu\text{mol.L}^{-1}$. La Figure 46 représente la variation d'angle mesurée pour cette concentration. Après injection de la protéine Nt-His-Fpg, l'angle augmente rapidement puis se stabilise. Après rinçage avec le tampon phosphate 50 mmol.L^{-1} pH 7, l'angle diminue très légèrement. Les protéines seulement adsorbées sont éliminées par le rinçage. Celles qui sont associées à la surface grâce au complexe histidine/Cu/NTA sont solidement immobilisées.

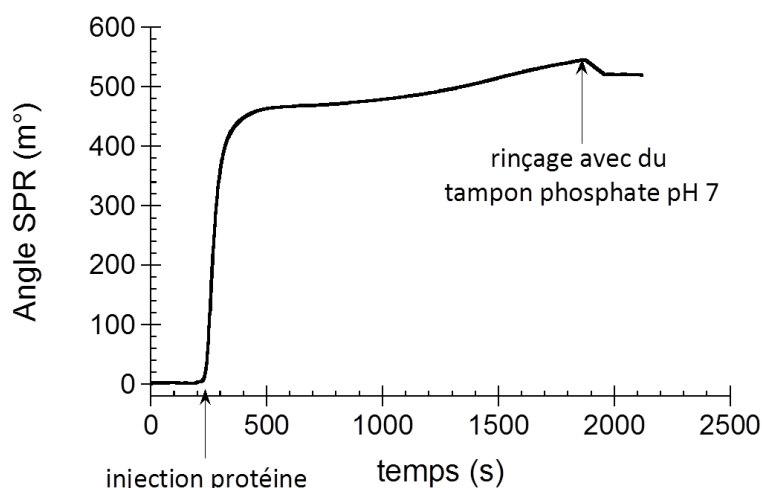


Figure 46. Réponse SPR représentant l'accrochage de la protéine Nt-Fpg-His ($2 \times 10^{-6} \text{ mol.L}^{-1}$) sur un film de poly-(pyrrole-NTA) formé par chronocoulométrie ($2,5 \text{ mC.cm}^{-2}$, $I = 50 \mu\text{A}$). Les mesures sont réalisées dans du tampon phosphate 50 mmol.L^{-1} pH 7 contenant $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$ de NaCl.

b. Immobilisation de la protéine Fpg-His-Ct

L'étude de la protéine Fpg-His-Ct dont la structure du gène est rappelée Figure 47, s'effectue par spectroscopie d'impédance électrochimique, une fois celle-ci immobilisée sur un film de poly-(pyrrole-NTA).

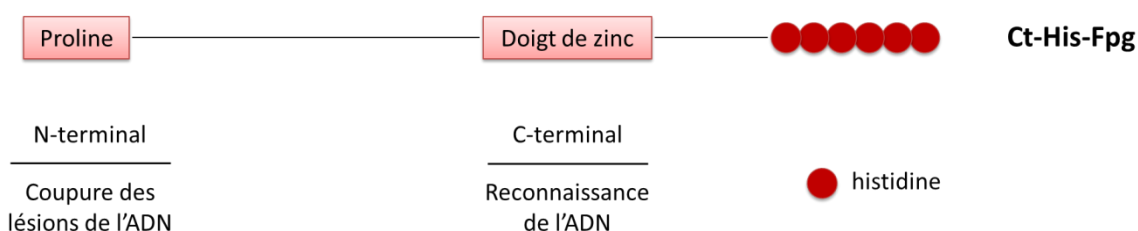


Figure 47. Structure schématique du gène de la protéine Ct-His-Fpg

Suite aux résultats obtenus précédemment avec la protéine Nt-His-Fpg, nous avons décidé de réduire la gamme de concentration à tester pour la protéine Ct-His-Fpg. Ainsi, trois concentrations de Ct-His-Fpg ont été testées : 2,1 ; 4,2 et $26,1 \mu\text{mol.L}^{-1}$. Comme précédemment, on procède par incubation successive du film de poly-(pyrrole-NTA) pendant

30 minutes dans une solution de Ct-His-Fpg préparée dans du tampon phosphate 50 mmol.L⁻¹ pH7 contenant 100 mmol.L⁻¹ de NaCl. Une fois, les électrodes rincées dans ce même tampon sous vive agitation pendant 15 minutes, un spectre d'impédance est enregistré. Les spectres d'impédance obtenus sont présentés Figure 48.

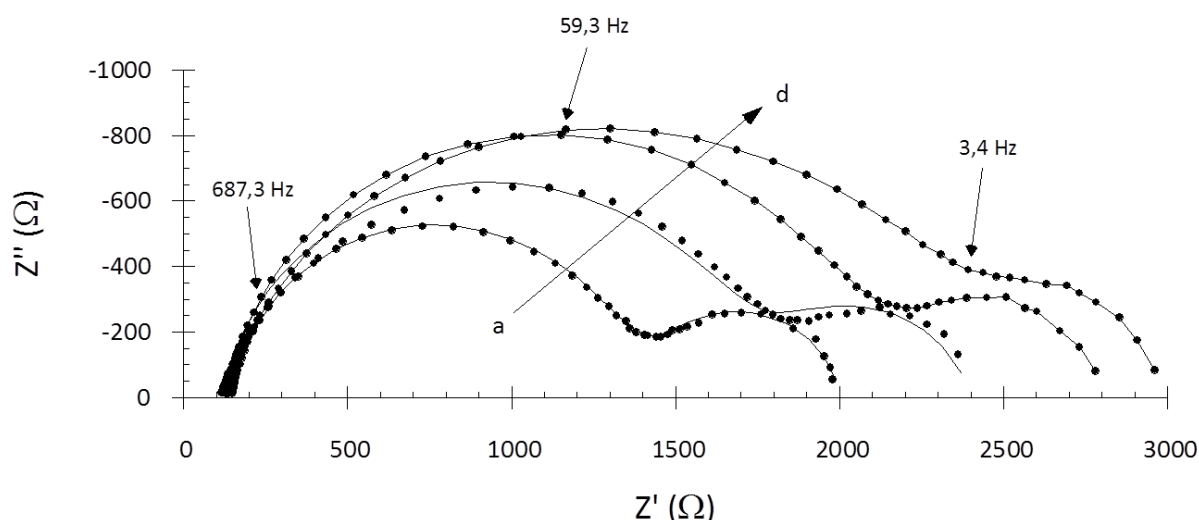


Figure 48 Diagrammes de Nyquist (a). du film de poly(pyrrole-NTA), puis après incubation avec différentes concentrations de protéines Ct-His-Fpg (b). 2×10^{-6} mol.L⁻¹, (c). 4×10^{-6} mol.L⁻¹ et (d). 2×10^{-5} mol.L⁻¹. Les valeurs expérimentales sont représentées par des points et l'ajustement avec le circuit équivalent par des lignes. Le film de poly-(pyrrole-NTA) est formé par chronocoulométrie ($Q = 2.5$ mC.cm⁻², $I = 10$ μ A), Gamme de fréquences 50 kHz à 0.1 Hz, $E_c = 0.325$ V vs. ECS, $\Delta E = 10$ mV_{rms}, $\Omega = 1$ 000 tour.min⁻¹, Sonde redox : hydroquinone 2 mmol.L⁻¹ dans du tampon phosphate 50 mmol.L⁻¹ pH7 + 100 mmol.L⁻¹ NaCl, température ambiante.

On remarque que lorsque la concentration en protéines immobilisées à la surface du film de poly-(pyrrole-NTA) augmente, l'impédance augmente comme dans le cas précédent avec la protéine Nt-His-Fpg. Donc quelle que soit la position de l'étiquette histidine, l'immobilisation de la protéine est possible. Ici aussi, c'est le demi-cercle de fréquence intermédiaire qui est affecté par la présence de concentrations croissantes de protéines, traduisant l'immobilisation de celles-ci à la surface du film de poly-(pyrrole-NTA).

Les valeurs issues de l'ajustement de ces données avec le circuit équivalent choisi, sont présentées Tableau 6.

Tableau 6. Valeurs issues de l'ajustement des données avec par le circuit équivalent de Randles choisi. R_{sol} : résistance de l'électrolyte, R_{TC} : résistance de transfert de charge, C_{DC} : capacité de double couche, f^0 : fréquence du point se trouvant au sommet du premier demi-cercle, n : exposant CPE caractéristique du décentrage du premier demi-cercle par rapport à l'axe des réels, R_δ : résistance de la diffusion de l'hydroquinone, τ_δ : constante de temps de la diffusion de l'hydroquinone, n_δ : angle de Warburg

[Fpg-His] (10^{-06} mol.L$^{-1}$)	0	2,1	4,2	26,1
$R_{sol}(\Omega)$	149 \pm 2	115 \pm 2	130 \pm 2	132 \pm 2
$R_{TC}(\Omega)$	1 180 \pm 18	1 545 \pm 23	1 874 \pm 28	2 039 \pm 31
$C_{DC}(\mu F)$	0,67 \pm 0,01	0,74 \pm 0,02	0,67 \pm 0,01	1,25 \pm 0,02
f^0 (Hz)	201	138	126	63
n	0,910	0,874	0,891	0,826
$R_\delta(\Omega)$	669 \pm 10	740 \pm 11	813 \pm 12	875 \pm 13
τ_δ (s)	0,36	0,39	0,39	0,44
n_δ	0,465	0,420	0,428	0,361

En ce qui concerne les paramètres du demi-cercle de fréquence intermédiaire, on remarque que les valeurs de la résistance de transfert de charge augmentent lors que la concentration en protéine augmente. Lorsque le film de poly-(pyrrole-NTA) est incubé avec une concentration de protéine de $2,1 \times 10^{-06}$ mol.L $^{-1}$, la différence de R_{TC} avec le film de poly-(pyrrole-NTA) est de 365 Ω . Avec une concentration en protéine de $4,2 \times 10^{-06}$ mol.L $^{-1}$, cette différence est de 694 Ω . Pour la concentration $26,1 \times 10^{-06}$ mol.L $^{-1}$, la résistance de transfert augmente de 859 Ω .

On trouve un taux de recouvrement électrochimique de 0,24 ; 0,37 et 0,42 respectivement pour les trois concentrations $2,1 \times 10^{-06}$ mol.L $^{-1}$, $4,2 \times 10^{-06}$ mol.L $^{-1}$ et $26,1 \times 10^{-06}$ mol.L $^{-1}$ en Ct-His-Fpg. Pour la protéine Nt-His-Fpg, on avait un taux de recouvrement électrochimique de 0,46 pour la concentration 4×10^{-06} mol.L $^{-1}$. On peut conclure que l'encombrement d'une protéine est plus élevé avec la Nt-His-Fpg qu'avec la Ct-His-Fpg.

La valeur de la capacité de double-couche C_{DC} a tendance à augmenter même si elle a la même valeur pour le film de poly-(pyrrole-NTA) et pour le polymère fonctionnalisé avec $4,2 \times 10^{-06}$ mol.L $^{-1}$ de protéine Ct-His-Fpg. Dans le cas précédent, avec la protéine Nt-His-Fpg, cette valeur diminuait. Il est possible que la position de l'étiquette tag histidine ait une influence

sur le repliement de la protéine. La valeur de n correspondant à l'exposant CPE caractéristique du décentrage du premier demi-cercle par rapport à l'axe des réels diminue également, traduisant ainsi une surface moins homogène contrairement au cas précédent, avec la protéine Nt-His-Fpg.

Concernant les valeurs caractéristiques de la diffusion, comme dans le cas précédent avec la protéine Nt-His-Fpg, il est difficile d'exploiter ces paramètres qui sont obtenus avec peu de points expérimentaux.

Pour vérifier que la protéine Ct-His-Fpg est bien immobilisée, des mesures de perméabilité sont effectuées avant et après incubation de la protéine. Suite aux expériences précédentes, la concentration de Ct-His-Fpg utilisée est de $2 \mu\text{mol.L}^{-1}$.

La perméabilité, P_m , d'un film de polymère électropolymérisé à la surface d'une électrode donne des informations sur sa capacité à laisser diffuser les espèces électroactives à l'interface film / électrolyte. Dans le cadre de ce travail, l'hydroquinone qui est une sonde redox, est utilisée pour déterminer la valeur du paramètre P_m . Pour cela, une voltampérométrie en régime stationnaire sur une électrode de carbone vitreux tournant à 250, 500, 750, 1000 et 1250 tour.min^{-1} est réalisée sur un film de poly-(pyrrole-NTA) seul (Figure 49). Ensuite une incubation avec les ions cuivre est effectuée avant la fonctionnalisation avec $2 \mu\text{mol.L}^{-1}$ de protéine Ct-His-Fpg. La voltampérométrie en régime stationnaire s'effectue à $0,01 \text{ V.s}^{-1}$ entre 0 et 0,5 V vs. ECS dans une solution d'hydroquinone 2 mmol.L^{-1} pH 7,6.

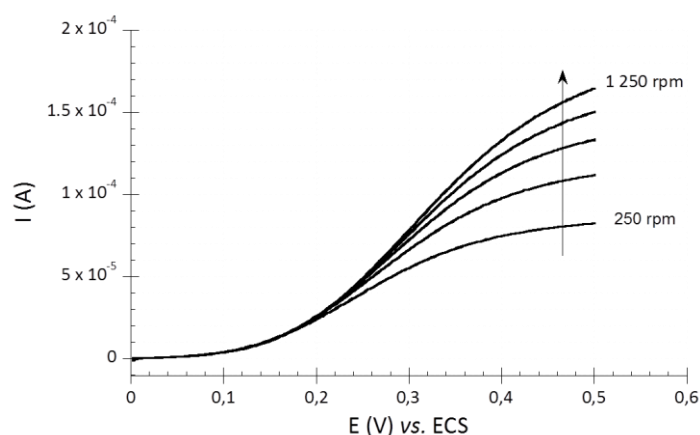


Figure 49. Voltampérogramme de l'hydroquinone 2 mmol.L^{-1} dans du tampon phosphate 50 mmol.L^{-1} pH7 + 100 mmol.L^{-1} NaCl, température ambiante sur une électrode de carbone vitreux (\varnothing : 3 mm) modifiée par un film de poly-(pyrrole-NTA) formé par chronocoulométrie ($Q= 2,5 \text{ mC.cm}^{-2}$, $I = 10 \mu\text{A}$). Vitesses de rotation de l'électrode Ω : 250, 500, 750, 1 000 et 1 250 tour.min^{-1} , $v_b = 0,01 \text{ V.s}^{-1}$.

Le courant limite d'oxydation de l'hydroquinone est déterminé pour différentes vitesses de rotation de l'électrode. Cette méthode donne accès à la valeur de la perméabilité P_m en utilisant l'équation de Koutecky-Levich (Équation 18). Ainsi, on peut tracer $\frac{1}{i_{limite}} = f \frac{1}{\Omega}$ qui est une droite (Figure 50) dont l'ordonnée à l'origine est la valeur de la perméabilité P_m .

Équation 18
$$\frac{1}{i_{limite}} = \frac{1}{i_s} + \frac{1}{i_m} = \frac{1}{0,62 n F D_s^{2/3} \nu^{-1/6} C_0 \Omega^{1/2}} + \frac{1}{n F P_m C_0}$$

avec i_{limite} : la densité de courant, i_s et i_m : les densités de courant de diffusion dans la solution et dans la membrane de polymère ($A.cm^{-2}$), n le nombre d'électron (2), F : la constante de Faraday ($96\,485\,C.mol^{-1}$), D_s : le coefficients de diffusion de la sonde en solution ($cm^2.s^{-1}$), ν : la viscosité cinématique de la solution ($cm^2.s^{-1}$), C_0 : la concentration de la sonde ($mol.cm^{-3}$), Ω : la vitesse de rotation de l'électrode ($rad.s^{-1}$) et P_m : la perméabilité du film ($cm.s^{-1}$).

Sur la Figure 50, On peut voir que les trois états de modifications de l'électrode modélisés d'après l'équation de Koutecky-Levich sont des droites relativement parallèles. Cela signifie que la perméabilité de ces 3 états de modifications de l'électrode est comparable.

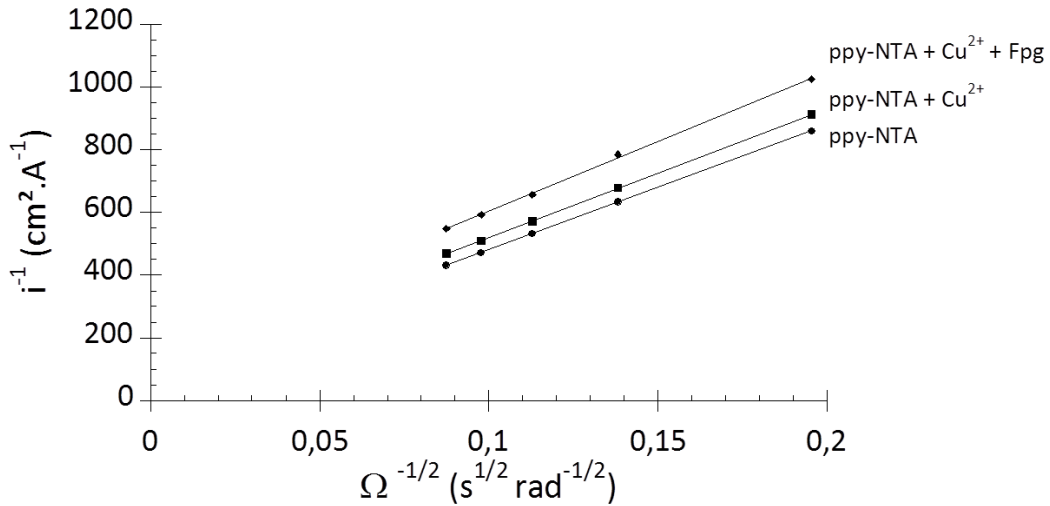


Figure 50. Droites de Koutecky-Levich obtenues à partir des voltampérogrammes réalisés entre 0 et 0,5 V vs. ECS, $v_b = 10\,mV.s^{-1}$, d'une électrode tournante de carbone vitreux ($\varnothing : 3\,mm$) sur laquelle un film de poly(pyrrole-NTA) (ppy-NTA) a été électropolymérisé puis incubé dans une solution de $CuCl_2$ puis fonctionnalisé avec la protéine Ct-His-Fpg ($2\,\mu mol.L^{-1}$). Sonde redox : hydroquinone $2\,mmol.L^{-1}$ dans du tampon phosphate $50\,mmol.L^{-1}\,pH7 + 100\,mmol.L^{-1}\,NaCl$, température ambiante

Le Tableau 7 présente les valeurs de perméabilité obtenues.

Tableau 7. Valeurs de perméabilité P_m obtenues pour les différents états de modification du film de poly-(pyrrole-NTA)

État de modification de l'électrode	Poly-(pyrrole-NTA)	+ Cu^{2+}	+ Fpg-His $2 \mu\text{mol.L}^{-1}$
$P_m \text{ (cm.s}^{-1}\text{)}$	$3,14 \times 10^{-2}$	$2,36 \times 10^{-2}$	$1,62 \times 10^{-2}$

À partir des valeurs de perméabilité, on peut dire que l'incubation du film de poly-(pyrrole-NTA) avec les ions cuivre modifie légèrement la perméabilité de celui-ci. Alors que lorsque la protéine Fpg-His est immobilisée à la surface de l'électrode, la valeur de perméabilité du film de poly-(pyrrole-NTA) est quasiment divisée par 2. Cette diminution de la valeur de P_m indique que la protéine Ct-His-Fpg est bien immobilisée sur le film de poly-(pyrrole-NTA).

L'immobilisation de la protéine Ct-His-Fpg, a aussi été vérifiée par mesure de SPR sur or. Nous avons dû diminuer les concentrations de protéines pour avoir des signaux exploitables. En effet, au-dessus d'une variation d'angle de 600m° , la réponse n'est plus linéaire avec la variation d'épaisseur de protéine sur la surface. Les concentrations de Ct-His-Fpg utilisées sont de $1 \mu\text{mol.L}^{-1}$ et $1,5 \mu\text{mol.L}^{-1}$. La Figure 51 représente la variation d'angle mesurée pour ces deux concentrations.

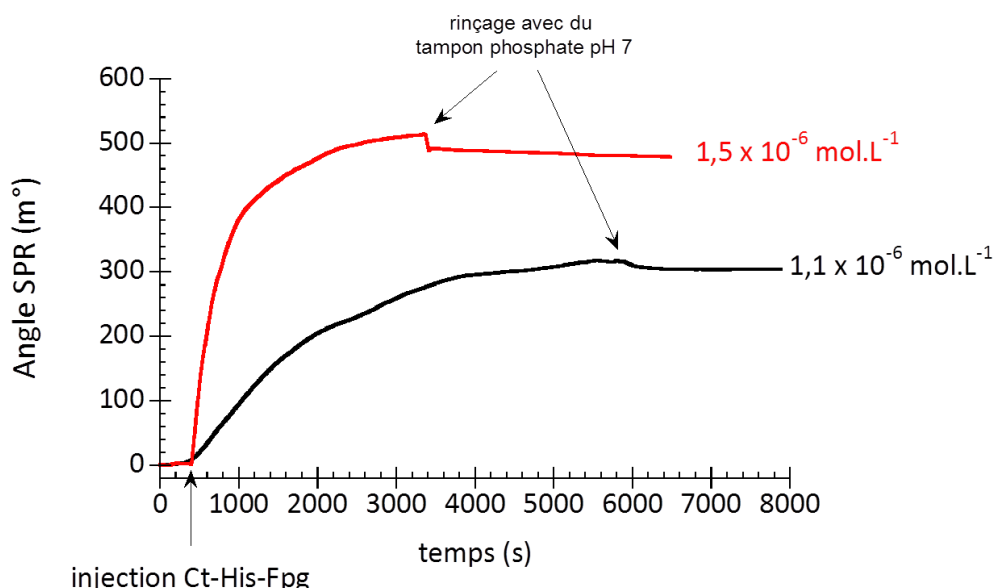


Figure 51. Réponses SPR représentant l'accrochage de deux concentrations différentes de protéine Ct-Fpg-His ($1,1 \times 10^{-6}$ et $1,5 \times 10^{-6} \text{ mol.L}^{-1}$) sur un film de poly-(pyrrole-NTA) formé par chronocoulométrie ($2,5 \text{ mC.cm}^{-2}$, $I = 50 \mu\text{A}$). Les mesures sont réalisées dans du tampon phosphate 50 mmol.L^{-1} pH 7 contenant $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$ de NaCl.

Après injection de la protéine Ct-His-Fpg, l'angle augmente rapidement puis se stabilise. Après rinçage avec le tampon phosphate, l'angle diminue très légèrement. Les protéines seulement adsorbées sont éliminées par le rinçage. Celles qui sont associées à la surface grâce au complexe histidine/Cu/NTA sont solidement immobilisées. L'immobilisation est proportionnelle à la concentration puisque l'on a une variation d'angle de 300 m° pour la concentration 1 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ et 480 m° pour la concentration 1,5 $\mu\text{mol.L}^{-1}$.

3. Interaction des protéines avec le duplex d'ADN sans lésion

a. Interaction de la protéine Nt-His-Fpg avec un duplex d'ADN sans lésion

Afin d'étudier l'interaction entre Nt-His-Fpg et l'ADN, le film de poly-(pyrrole-NTA) va être fonctionnalisé avec $4 \times 10^{-6} \text{ mol.L}^{-1}$ de Nt-His-Fpg. Cette électrode sera ensuite incubée successivement avec des différentes concentrations croissantes d'ADN double-brin (10^{-12} , 10^{-9} , 10^{-7} et $10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$) ne comportant pas de lésion, pendant 30 minutes. L'électrode sera rincée sous vive agitation pendant 15 minutes après chaque incubation dans du tampon phosphate 50 mmol.L^{-1} pH7 contenant 100 mmol.L^{-1} de NaCl. Puis un spectre d'impédance sera enregistré. Les spectres d'impédance obtenus sont présentés Figure 52.

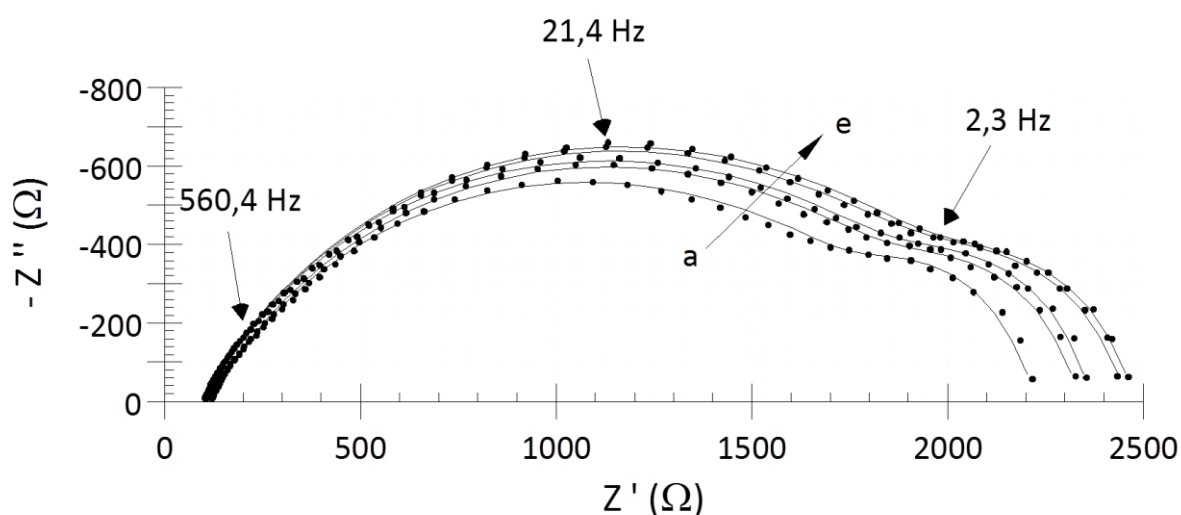


Figure 52. Diagrammes de Nyquist obtenus après incubation du film de poly(pyrrole-NTA) fonctionnalisé avec (a). $4 \times 10^{-6} \text{ mol.L}^{-1}$ de protéine Nt-His-Fpg en absence d'ADN puis incubé avec différentes concentrations d'ADN : (b). $10^{-12} \text{ mol.L}^{-1}$, (c). $10^{-9} \text{ mol.L}^{-1}$, (d). $10^{-7} \text{ mol.L}^{-1}$, €. $10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$. Les valeurs expérimentales sont représentées par des points et l'ajustement avec le circuit équivalent par des lignes. Le film de poly-(pyrrole-NTA) est formé par chronocoulométrie ($Q = 2.5 \text{ mC.cm}^{-2}$, $I = 10 \text{ } \mu\text{A}$), Gamme de fréquences 50 kHz à 0.1 Hz, $E_c = 0.325 \text{ V vs. ECS}$, $\Delta E = 10 \text{ mV}_{rms}$, $\Omega = 1000 \text{ tour.min}^{-1}$, Sonde redox : hydroquinone 2 mmol.L^{-1} dans du tampon phosphate 50 mmol.L^{-1} pH7 + 100 mmol.L^{-1} NaCl, température ambiante.

Il faut noter que l'ADN va interagir avec le doigt de zinc se trouvant du côté C-terminal où il n'y a pas d'étiquette tag histidine.

Sur la Figure 52, nous remarquons que les spectres d'impédances obtenus sont composés de deux boucles et se différencient facilement de celui obtenu pour le polymère fonctionnalisé avec la protéine Nt-His-Fpg ($4 \times 10^{-6} \text{ mol.L}^{-1}$). Le demi-cercle de fréquence intermédiaire est le plus affecté par la présence de l'ADN. Il augmente régulièrement avec la concentration d'ADN. Les valeurs issues de l'ajustement de ces données avec le circuit choisi, sont présentées Tableau 8.

Tableau 8. Valeurs issues de l'ajustement des données avec par le circuit équivalent de Randles choisi. R_{sol} : résistance de l'électrolyte, R_{TC} : résistance de transfert de charge, C_{DC} : capacité de double couche, f^0 : fréquence du point se trouvant au sommet du premier demi-cercle, n : exposant CPE caractéristique du décentrage du premier demi-cercle par rapport à l'axe des réels, R_δ : résistance de la diffusion de l'hydroquinone, τ_δ : constante de temps de la diffusion de l'hydroquinone, n_δ : angle de Warburg

[ADN] (mol.L ⁻¹)	0	10 ⁻¹²	10 ⁻⁰⁹	10 ⁻⁰⁷	10 ⁻⁰⁵
$R_{\text{sol}}(\Omega)$	114 ± 2	115 ± 2	95 ± 1	100 ± 2	100 ± 1
$R_{\text{TC}}(\Omega)$	1 859 ± 28	1 964 ± 29	2 001 ± 30	2 029 ± 30	2 066 ± 31
$C_{\text{DC}}(\mu\text{F})$	4,46 ± 0,07	4,22 ± 0,07	4,01 ± 0,06	3,54 ± 0,06	3,57 ± 0,06
$f^0(\text{Hz})$	19	19	20	22	22
n	0,679	0,686	0,690	0,701	0,702
$R_\delta(\Omega)$	262 ± 4	268 ± 4	282 ± 4	335 ± 5	316 ± 5
$\tau_\delta(\text{s})$	0,31	0,32	0,30	0,32	0,32
n_δ	0,602	0,584	0,580	0,536	0,549

Concernant les paramètres caractéristiques de la diffusion, ils ne seront pas exploités comme précédemment.

Concernant la résistance de transfert de charge R_{TC} , elle augmente progressivement lorsque le film de poly-(pyrrole-NTA) fonctionnalisé avec la protéine His-Nt-Fpg est incubé avec des concentrations croissantes d'ADN. Par contre, la valeur de la capacité de double-couche diminue C_{DC} .

b. Interaction entre la protéine Ct-His-Fpg et un duplex d'ADN

Chaque concentration de Ct-Fpg-His testées précédemment (2,1 ; 4,24 et 26,1 $\mu\text{mol.L}^{-1}$) a été incubée successivement avec différentes concentrations d'ADN (10^{-12} , 10^{-9} , 10^{-7} et 10^{-5} mol.L^{-1}) (Figure 53).

Il faut noter que l'ADN va interagir avec le doigt de zinc se trouvant du côté C-terminal où on a aussi l'étiquette tag histidine.

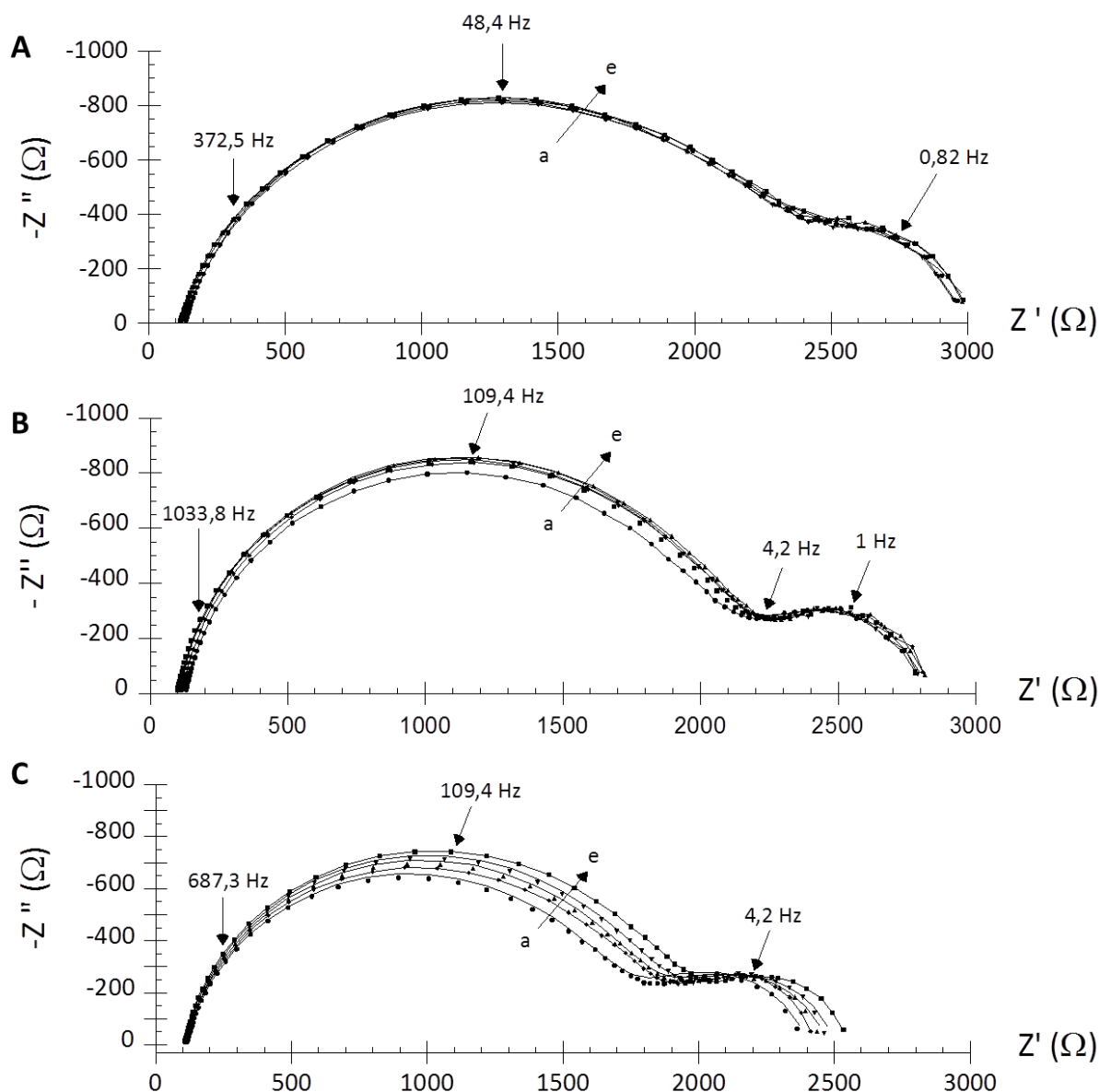


Figure 53. Diagrammes de Nyquist obtenus après incubation du poly-(pyrrole-NTA) avec a. A. 26.1 $\mu\text{mol.L}^{-1}$, B. 4.2 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ et C. 2.1 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ de protéine Ct-His-Fpg puis incubée avec différentes concentration d'ADN : b. 10^{-12} mol.L^{-1} , c. 10^{-9} mol.L^{-1} , d. 10^{-7} mol.L^{-1} et e. 10^{-5} mol.L^{-1} . Les valeurs expérimentales sont représentées par des points et l'ajustement avec le circuit équivalent par des lignes. Le poly-(pyrrole-NTA) est formé par chronocoulométrie ($Q = 2,5 \text{ mC.cm}^{-2}$, $I = 10 \mu\text{A}$), Gamme de fréquences 50 kHz à 0.1 Hz, $E_c = 0,325 \text{ V vs. ECS}$, ΔE

= 10 mV_{rms}, Ω = 1 000 tour.min⁻¹, Sonde redox : hydroquinone 2 mmol.L⁻¹ dans du tampon phosphate 50 mmol.L⁻¹ pH7 + 100 mmol.L⁻¹ NaCl, température ambiante.

Lorsque la concentration de protéine est de $26,1 \times 10^{-06}$ mol.L⁻¹, il est difficile de distinguer le spectre correspondant au film fonctionnalisé avec la protéine puis ceux dû à l'augmentation de la concentration d'ADN. Il semblerait que la surface soit déjà saturée par la protéine et qu'il n'y ait plus de place pour l'interaction avec les duplex d'ADN.

Lorsque le film de poly-(pyrrole-NTA) est incubé avec une concentration de 4×10^{-06} mol.L⁻¹ de protéine, on arrive à distinguer le spectre du film de poly-(pyrrole-NTA) fonctionnalisé avec la protéine de ceux obtenus après incubation avec l'ADN. Tous les spectres enregistrés après incubations successives avec différentes concentrations d'ADN semblent cependant identiques.

Lorsque le film de poly-(pyrrole-NTA) est incubé avec une concentration de 2×10^{-06} mol.L⁻¹ de protéine, tous les spectres d'impédance sont distincts. La résistance de transfert de charge augmente après chaque incubation dans des solutions de concentrations croissantes d'ADN.

Les données expérimentales présentées Figure 53 ont été ajustées par un circuit avec le logiciel Z-View. Les valeurs obtenues sont présentées Tableau 9.

Tableau 9. Valeurs issues de l'ajustement des données avec par le circuit équivalent de Randles choisi. R_{sol} : résistance de l'électrolyte, R_{TC} : résistance de transfert de charge, C_{DC} : capacité de double couche, f^0 : fréquence du point se trouvant au sommet du premier demi-cercle, n : exposant CPE caractéristique du décentrage du premier demi-cercle par rapport à l'axe des réels, R_δ : résistance de la diffusion de l'hydroquinone, τ_δ : constante de temps de la diffusion de l'hydroquinone, n_δ : angle de Warburg

[Ct-His-Fpg] $\mu\text{mol.L}^{-1}$	[ADN] (mol.L^{-1})	0	10^{-12}	10^{-09}	10^{-07}	10^{-05}
26,1	$R_{sol}(\Omega)$	132 ± 2	130 ± 2	114 ± 2	121 ± 2	113 ± 2
	$R_{TC}(\Omega)$	$2\,047 \pm 31$	$2\,080 \pm 31$	$2\,033 \pm 30$	$1\,985 \pm 30$	$2\,054 \pm 31$
	$C_{DC}(\mu F)$	$1,25 \pm 0,02$	$1,29 \pm 0,02$	$1,26 \pm 0,02$	$1,24 \pm 0,02$	$1,26 \pm 0,02$
	$f^0(\text{Hz})$	62	60	62	65	62
	n	0,825	0,818	0,827	0,829	0,825
	$R_\delta(\Omega)$	861 ± 13	797 ± 12	923 ± 14	937 ± 14	901 ± 14
	$\tau_\delta(\text{s})$	0,43	0,42	0,44	0,45	0,43
	n_δ	0,365	0,390	0,353	0,337	0,354
4,2	$R_{sol}(\Omega)$	130 ± 2	118 ± 2	108 ± 2	102 ± 2	98 ± 1
	$R_{TC}(\Omega)$	$1\,873 \pm 28$	$1\,955 \pm 29$	$1\,989 \pm 30$	$1\,966 \pm 29$	$1\,960 \pm 29$
	$C_{DC}(\mu F)$	$0,67 \pm 0,01$	$0,66 \pm 0,01$	$0,64 \pm 0,01$	$0,65 \pm 0,01$	$0,65 \pm 0,01$
	$f^0(\text{Hz})$	126	124	125	125	125
	n	0,892	0,895	0,897	0,897	0,897
	$R_\delta(\Omega)$	815 ± 12	768 ± 12	744 ± 11	754 ± 11	748 ± 11
	$\tau_\delta(\text{s})$	0,39	0,38	0,37	0,39	0,36
	n_δ	0,427	0,435	0,445	0,432	0,450
2,1	$R_{sol}(\Omega)$	115 ± 2	114 ± 2	110 ± 2	107 ± 2	106 ± 2
	$R_{TC}(\Omega)$	$1\,542 \pm 23$	$1\,630 \pm 24$	$1\,650 \pm 25$	$1\,695 \pm 25$	$1\,754 \pm 25$
	$C_{DC}(\mu F)$	$0,74 \pm 0,02$	$0,73 \pm 0,02$	$0,72 \pm 0,02$	$0,71 \pm 0,02$	$0,69 \pm 0,01$
	$f^0(\text{Hz})$	139	134	135	133	131
	n	0,8759	0,879	0,883	0,885	0,888
	$R_\delta(\Omega)$	743 ± 11	705 ± 11	714 ± 11	698 ± 10	710 ± 11
	$\tau_\delta(\text{s})$	0,40	0,38	0,39	0,38	0,39
	n_δ	0,417	0,427	0,418	0,421	0,420

En comparant les spectres d'impédance obtenus pour $4 \mu\text{mol.L}^{-1}$ de Nt-His-Fpg (Figure 52) et $4 \mu\text{mol.L}^{-1}$ Ct-His-Fpg (Figure 53), on remarque que ces deux protéines n'ont pas le même comportement. En effet, pour une concentration de $4 \mu\text{mol.L}^{-1}$, la protéine Nt-His-Fpg semble interagir avec une gamme de concentration d'ADN double-brin plus importante que la protéine Ct-His-Fpg dont les spectres d'impédance ne varient presque plus après incubation avec une concentration d'ADN de $10^{-12} \text{ mol.L}^{-1}$. Avec la protéine Nt-His-Fpg, le doigt de zinc permettant de lier l'ADN est à l'opposé du tag histidine qui lui est situé coté polymère (Figure 54A). Avec la protéine Ct-His-Fpg, le doigt de zinc permettant de lier l'ADN est du même côté que le tag histidine (Figure 54B). En diminuant par deux la concentration de protéine Ct-His-Fpg immobilisée à la surface ($2 \mu\text{mol.L}^{-1}$ en protéine Ct-His-Fpg), il est possible de remédier à la mauvaise orientation de la protéine induite par la position de l'étiquette tag histidine sur le C terminal (proche du doigt de zinc).

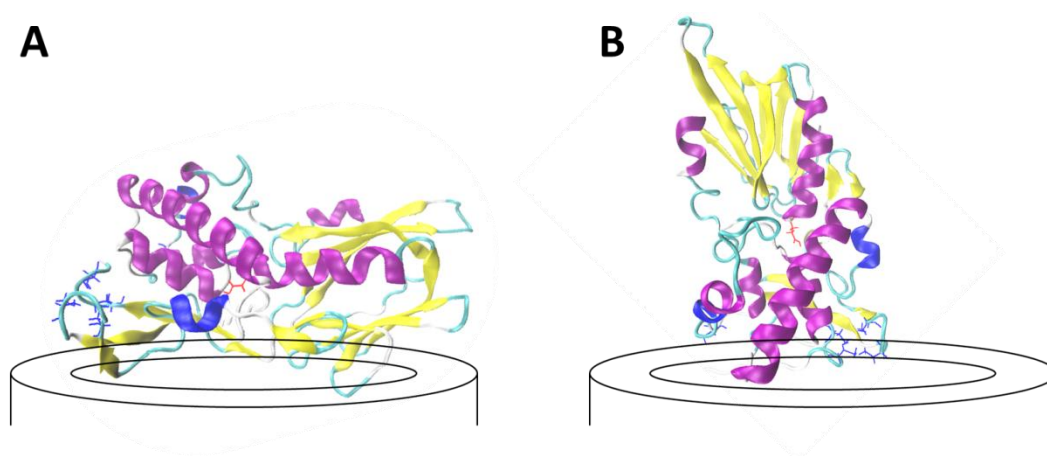


Figure 54. Schéma simplifiée de l'immobilisation de la protéine (A) Nt-His-Fpg et (B) Ct-His-Fpg sur une électrode de carbone vitreux fonctionnalisée avec un film de poly-(pyrrole-NTA) / Cu^{2+} .

La position externe du doigt de zinc dans la protéine Nt-His-Fpg pour interagir favorablement avec l'ADN n'est pas le seul critère à prendre en compte dans la fabrication du biocapteur à lésion d'ADN. En présence d'un ADN lésé, la réparation implique la formation d'une base de Schiff avec la proline se situant du côté N-terminal de la protéine Fpg. La position externe de la proline (loin du tag histidine) dans la protéine Ct-His-Fpg n'est donc pas à négliger.

Le compromis pour la suite de ce travail a donc été de choisir la position privilégiée de la proline dans la protéine Ct-His-Fpg pour favoriser la réparation de l'ADN, mais avec une

concentration de $2 \mu\text{mol.L}^{-1}$ en protéine Ct-His-Fpg pour remédier à la mauvaise orientation du doigt de zinc de la protéine.

4. Élaboration du biocapteur pour la détection de l'ADN par la protéine Fpg-His-Ct

a. Détection par impédancemétrie

Une fois le film de poly-(pyrrole-NTA) fonctionnalisé avec $2 \mu\text{mol.L}^{-1}$ de protéine Ct-Fpg-His, des incubations successives avec de l'ADN double-brin ne comportant pas de lésions sont effectuées. Après chaque concentration d'ADN testé, un spectre d'impédance est réalisé. Les résultats obtenus sont représentés Figure 55.

Sur la Figure 55 sont représentés les spectres d'impédance obtenus pour des concentrations d'ADN comprises entre $10^{-15} \text{ mol.L}^{-1}$ et $10^{-10} \text{ mol.L}^{-1}$. Ces spectres sont composés de deux boucles. La première, correspondant aux hautes fréquences, traduit la résistance de transfert de charge de l'hydroquinone. Le diamètre de cette boucle augmente après chaque incubation avec l'ADN. Ainsi, on peut dire que l'ADN interagit avec la protéine immobilisée. La seconde boucle correspondant aux basses fréquences est attribuée à la diffusion de la sonde redox.

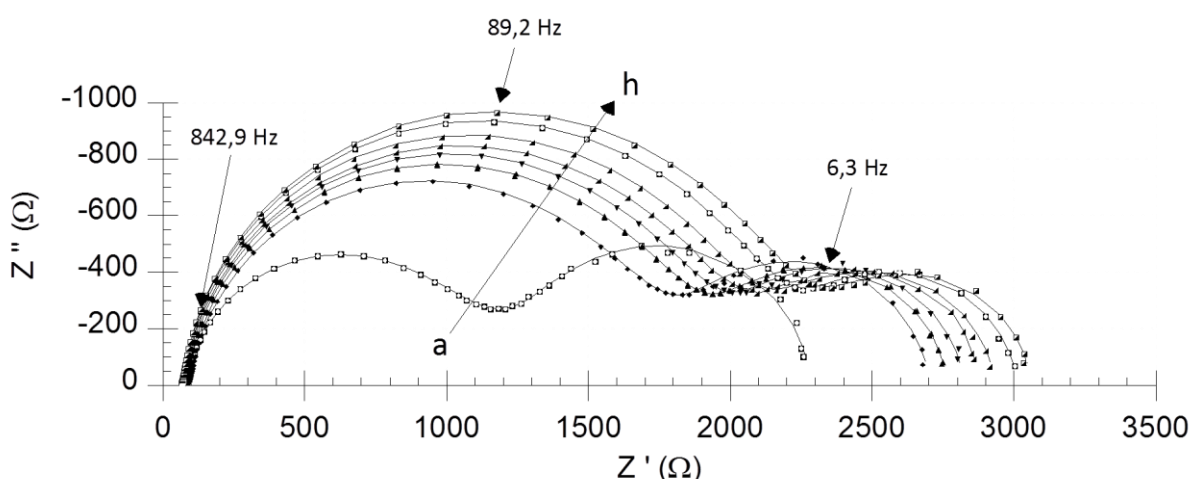


Figure 55. Diagrammes de Nyquist obtenu pour une électrode de carbone vitreux (3 mm de diamètre) : (a). poly-(pyrrole-NTA), (b). poly(pyrrole-NTA) + Ct-His-Fpg $2 \mu\text{mol.L}^{-1}$. Ensuite l'électrode est incubée avec différentes concentration d'ADN double-brin ne comportant pas de lésions : (c). $10^{-15} \text{ mol.L}^{-1}$, (d). $10^{-14} \text{ mol.L}^{-1}$, (e). $10^{-13} \text{ mol.L}^{-1}$, (f). $10^{-12} \text{ mol.L}^{-1}$, (g). $10^{-11} \text{ mol.L}^{-1}$, (h). $10^{-10} \text{ mol.L}^{-1}$. Les valeurs expérimentales sont représentées par des points et l'ajustement avec le circuit équivalent par des lignes. Le poly-(pyrrole-NTA) est formé par chronocoulométrie ($Q = 2,5 \text{ mC.cm}^{-2}$, $I = 10 \mu\text{A}$), Gamme de fréquences 50 kHz à 0.1 Hz, $E_c = 0,325 \text{ V}$ vs. ECS, $\Delta E = 10 \text{ mV}_{\text{rms}}$, $\Omega = 1000 \text{ tour.min}^{-1}$, Sonde redox : hydroquinone 2 mmol.L^{-1} dans du tampon phosphate 50 mmol.L^{-1} pH7 + 100 mmol.L^{-1} NaCl, température ambiante

Afin d'analyser ces résultats, ces valeurs expérimentales sont ajustées par le circuit équivalent à l'aide du logiciel Z-View et sont présentées dans le Tableau 10.

Tableau 10. Valeurs issues de l'ajustement des données avec par le circuit équivalent de Randles choisi. R_{sol} : résistance de l'électrolyte, R_{TC} : résistance de transfert de charge, C_{DC} : capacité de double couche, f^0 : fréquence du point se trouvant au sommet du premier demi-cercle, n : exposant CPE caractéristique du décentrage du premier demi-cercle par rapport à l'axe des réels, R_δ : résistance de la diffusion de l'hydroquinone, τ_δ : constante de temps de la diffusion de l'hydroquinone, n_δ : angle de Warburg

État de modification de l'électrode	polymère	+ Fpg-His 2 $\mu\text{mol.L}^{-1}$	[ADN] mol.L^{-1}					
			10^{-15}	10^{-14}	10^{-13}	10^{-12}	10^{-11}	10^{-10}
$R_{sol}(\Omega)$	85 ± 1	96 ± 1	88 ± 1	81 ± 1	77 ± 1	73 ± 1	69 ± 1	69 ± 1
$R_{TC}(\Omega)$	977	1 568	1 696	1 769	1 844	1 915	2 021	2 094
	± 15	± 24	± 25	± 27	± 28	± 29	± 30	± 31
$C_{DC}(\mu\text{F})$	0,83	0,81	0,80	0,80	0,80	0,79	0,78	0,78
	$\pm 0,02$	$\pm 0,02$	$\pm 0,02$	$\pm 0,02$	$\pm 0,02$	$\pm 0,02$	$\pm 0,02$	$\pm 0,02$
$f^0(\text{Hz})$	197	126	118	114	109	106	101	98
n	0,925	0,925	0,927	0,929	0,929	0,931	0,932	0,933
$R_\delta(\Omega)$	1 224	1 038	980	973	966	947	922	899
	± 18	± 16	± 15	± 15	± 14	± 14	± 14	± 13
$\tau_\delta(\text{s})$	0,33	0,35	0,35	0,35	0,36	0,36	0,36	0,36
n_δ	0,474	0,474	0,474	0,471	0,468	0,465	0,468	0,468

La résistance de transfert de charge est le paramètre qui varie le plus. En effet, après chaque incubation, on note une augmentation de la valeur de R_{TC} , ce qui indique un encombrement de la surface et donc une interaction de l'ADN double-brin avec la protéine. La valeur de la fréquence f^0 (99 Hz) diminue quasiment de moitié, ce qui indique un ralentissement du transfert d'électron. La capacité de double couche diminue très légèrement. La valeur de n l'exposant CPE dont la valeur est d'environ 0,93, indique une surface assez homogène.

À partir des données du Tableau 10, les graphes, présentés Figure 56 et Figure 57, sont tracés.

Les données expérimentales présentées sur le graphe de la Figure 56, ont été ajustées avec le modèle de Langmuir-Freundlich dont l'équation est donnée ci-dessous (Équation 19).

Équation 19

$$\Delta R_{TC} = \frac{ADN^n R_{TC_{max}}}{ADN^n + K_d}$$

Où K_d est la constante de dissociation entre l'ADN double-brin et le poly-(pyrrole-NTA) fonctionnalisé avec la protéine Ct-His-Fpg et n le coefficient de Freundlich qui permet de tenir compte de l'hétérogénéité de la surface.

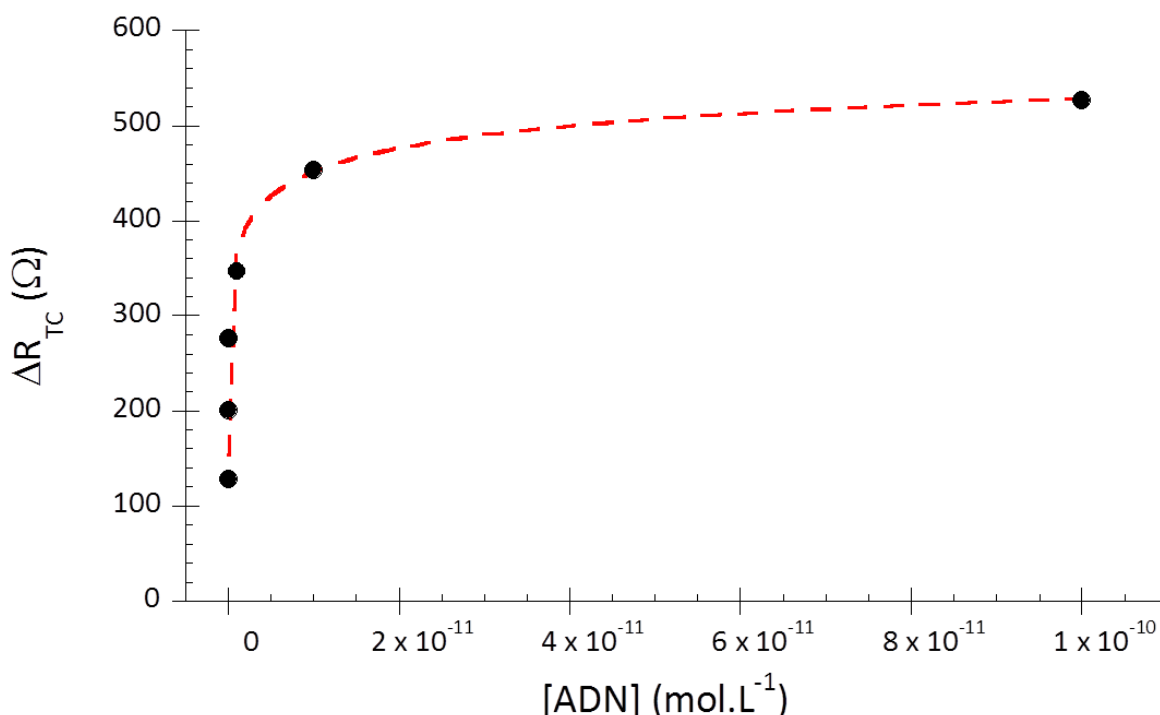


Figure 56. Valeurs de ΔR_{TC} obtenus avec $2 \mu mol.L^{-1}$ de protéine Ct-His-Fpg pour différentes concentrations d'ADN. Les valeurs ont été ajustées avec le modèle de Langmuir-Freundlich (— — —) ($R^2 = 0,997$)

Sur ce graphe, on remarque une partie linéaire qui augmente entre 10^{-15} et $10^{-12} mol.L^{-1}$ puis on observe la formation d'un plateau suggérant que la surface de film de poly-(pyrrole-NTA) fonctionnalisée avec la protéine Ct-His-Fpg commence à être saturée pour des concentrations d'ADN supérieures à $10^{-11} mol.L^{-1}$. Ainsi, après utilisation du modèle de Langmuir-Freundlich, les paramètres trouvés sont les suivants : $n = 0,219 \pm 0,03$; $R_{TC_{max}} = 712 \pm 74 \Omega$ et $K_d = 2,3 \times 10^{-3} mol.L^{-1}$ soit une constante d'association K_a de $438 L.mol^{-1}$.

La Figure 57 présente une évolution linéaire de ΔR_{TC} en fonction du logarithme décimal de la concentration d'ADN et montre une gamme de linéarité entre 10^{-15} et $10^{-10} mol.L^{-1}$ d'ADN avec une sensibilité de $80,5 \Omega / \text{unité logarithmique de concentration d'ADN}$ ($R^2 = 0,996$).

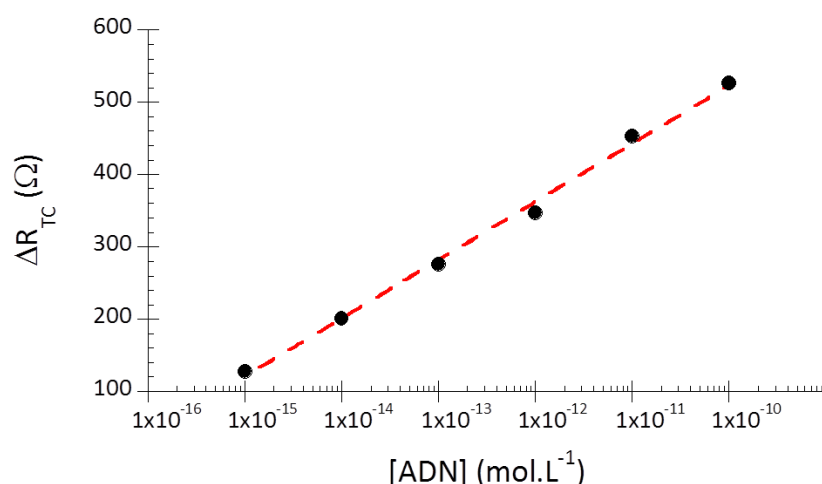


Figure 57. Courbe d'étalonnage de la détection de duplex d'ADN par la protéine Nt-His-Fpg, indiquant la variation des résistances de transfert de charge ΔR_{TC} en fonction de la concentration en ADN (échelle logarithmique). Les points sont obtenus à partir du tableau 10.

b. Détection par conductimétrie

La spectroscopie d'impédance électrochimique reste une technique lourde car les temps d'acquisition sur les larges gammes de fréquences balayées sont assez longs. En effet, il faut 3 minutes pour obtenir un spectre d'impédance pour une concentration d'ADN. Une fois le spectre enregistré ; les données expérimentales ne peuvent pas être utilisées telles quelles. Elles doivent être ajustées à l'aide d'un circuit électrique équivalent.

Donc dans le but de rendre cette technique attractive et de faciliter la détection, l'étalonnage de l'ADN par la protéine Ct-His-Fpg a été entrepris. Ce type de mesures est réalisé en appliquant une tension électrique alternative à une fréquence donnée et permet de mesurer les variations de conductance ; celle-ci est inversement proportionnelle à la résistance. Puisque chaque point du spectre d'impédance dans le plan de Nyquist représente les valeurs des parties réelle et imaginaire de $Z(\omega)$ pour une fréquence donnée, on peut connaître le module de l'impédance $|Z(\omega)|$ pour chaque concentration en ADN. Nous avons donc mesuré les variations du module d'impédance à une fréquence de 32,15 Hz en fonction de la concentration en ADN. La Figure 58 rappelle les spectres d'impédance obtenus avec des concentrations croissantes en ADN tandis que la ligne représentée sur ces spectres montre les points où la fréquence $f = 32,15$ Hz. Il est intéressant de noter que cette fréquence se situe avant la fin de la première boucle.

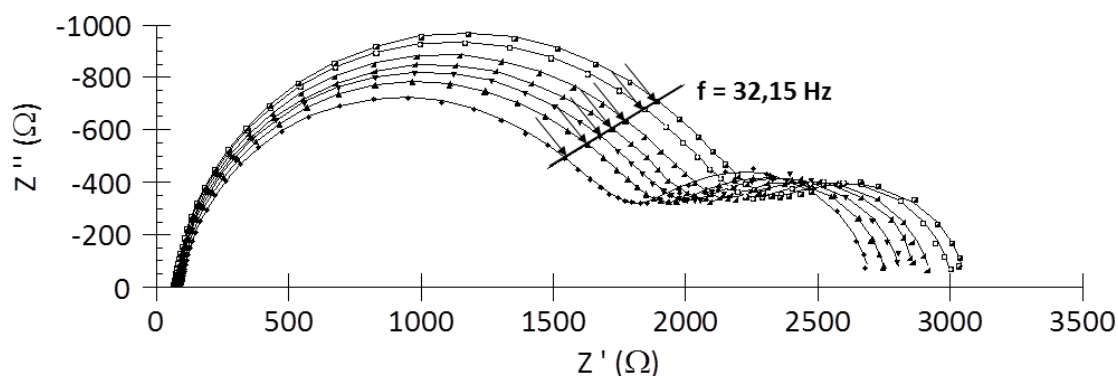


Figure 58. Droite indiquant la fréquence utilisée pour les mesures conductimétriques ($f = 32,15$ Hz) en reprenant les mesures impédancemétrique de la figure 33.

La Figure 59 montre les résultats obtenus par conductimétrie pour une concentration de Ct-His-Fpg de $2 \mu\text{mol.L}^{-1}$.

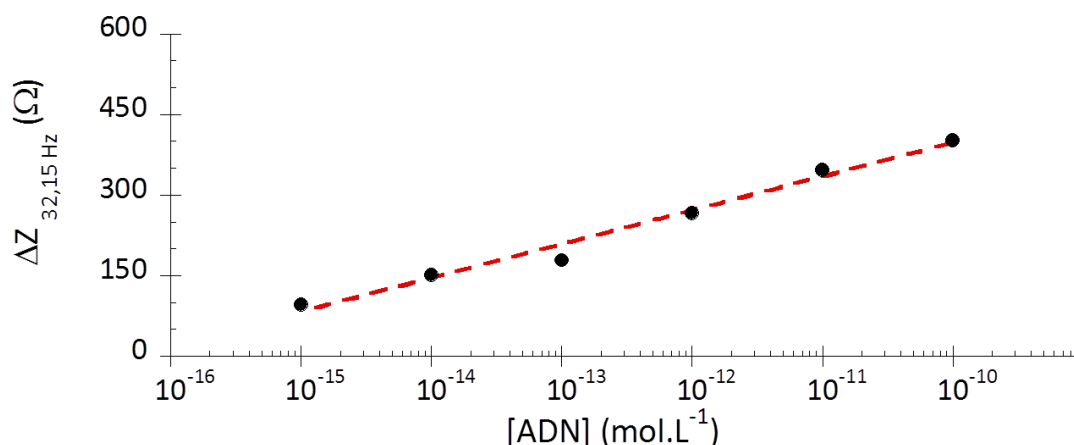


Figure 59. Courbe d'étalonnage de la détection de duplex d'ADN par la protéine Nt-His-Fpg, indiquant la variation du module d'impédance ΔZ à la fréquence $f = 32,15$ Hz ($R^2 = 0,991$)

Cette méthode a permis de mettre en évidence une relation linéaire pour une gamme de concentration d'ADN comprise entre 10^{-15} et $10^{-10} \text{ mol.L}^{-1}$ avec une sensibilité de $62,8 \Omega$ par unité logarithmique de concentration d'ADN ($R^2 = 0,996$).

La pente obtenue par conductimétrie est plus faible que celle obtenue par impédancemétrie qui était de $80,5 \Omega / \text{unité logarithmique}$. Ceci est logique puisque la contribution de la résistance de l'électrolyte et de la résistance de diffusion existent entièrement ou en partie dans la mesure conductimétrique alors qu'elles sont inexistantes après calculs des résistances pures après ajustements. La mesure conductimétrique a, même avec une sensibilité plus faible, de nombreux avantages comme la rapidité et la simplicité de réalisation.

IV. Étude de l'interaction de la protéine Fpg avec un double-brin d'ADN avec lésions

Afin de faire la différence entre l'interaction d'un ADN sans lésion et un ADN avec lésion sur les surfaces modifiées par les protéines Fpg, des mesures d'impédance *in situ* peuvent être réalisées. Cette méthode consiste en l'enregistrement de l'impédance (le module $|Z|$ ainsi que la phase φ) à une fréquence fixe suite à l'application d'un potentiel de perturbation.

Nous avons choisi de baisser la température afin de ralentir le phénomène de coupure de l'ADN lésé par la protéine Fpg. Les résultats présentés ont été obtenus à 5 °C. Une fois le film de poly-(pyrrole-NTA) fonctionnalisé avec 2 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ de protéine Ct-His-Fpg, l'impédance de l'électrode modifiée est mesurée à une seule fréquence au cours du temps. La fréquence choisie pour cette mesure est 32,15 Hz puisque l'on a vu qu'elle correspondait à la fin du demi-cercle de fréquence intermédiaire. À cette fréquence, la variation du module de l'impédance est majoritairement due à la variation de la résistance de transfert de charge.

Ces mesures en chrono-impédancemétrie sont beaucoup plus délicates à réaliser. De nombreux essais ont été effectués qui n'ont pas tous été concluants. Afin de trouver les conditions expérimentales exactes pour réussir ces mesures nous avons travaillé dans un premier temps avec de l'ADN sans lésion. La Figure 60, représente le résultat obtenu par mesure de chrono-impédancemétrie à 32,15 Hz et 5°C pour un ADN sans lésion. L'injection de l'ADN dans la cellule a été réalisée après stabilisation du signal d'impédance. À partir de l'injection, on voit que les deux paramètres module de l'impédance et déphase sont modifiés. Le module de l'impédance et le déphasage (en valeur absolue) augmentent.

Les mesures sont réalisées dans une solution d'hydroquinone 2 mmol.L^{-1} préparée dans du tampon phosphate pH 7. La concentration finale d'ADN est de $10^{-07} \text{ mol.L}^{-1}$.

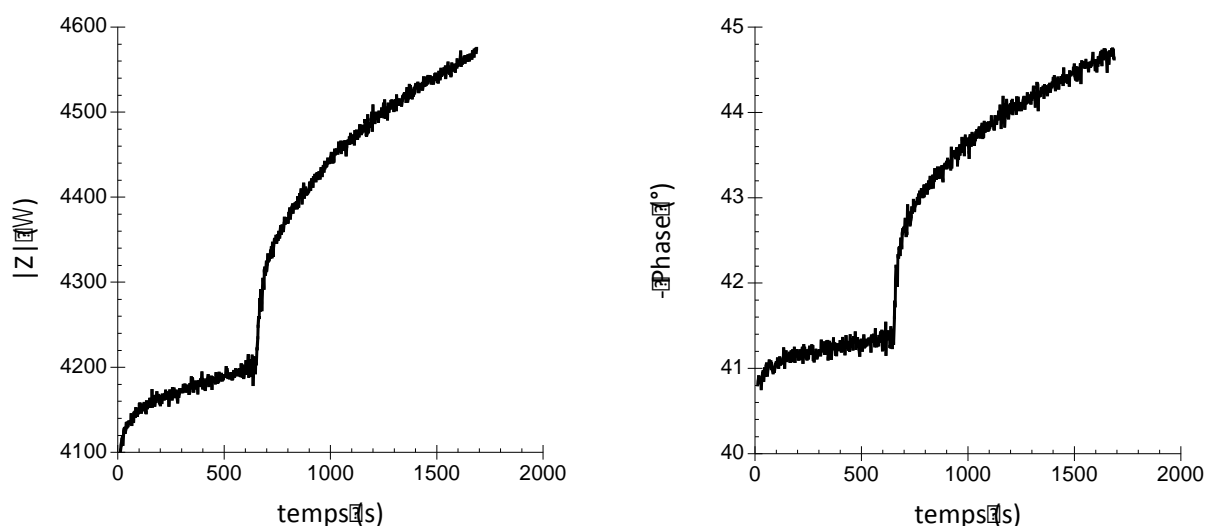


Figure 60. Mesures de chrono-impédancemétrie réalisées avec une électrode de poly-(pyrrole-NTA) fonctionnalisée avec $2 \mu\text{mol.L}^{-1}$ de Ct-His-Fpg en présence d'ADN double sans lésions. Les mesures sont réalisées dans une solution d'hydroquinone 2 mmol.L^{-1} préparée dans du tampon phosphate pH 7. La concentration finale d'ADN, dans la cellule d'électrochimie, est de $10^{-07} \text{ mol.L}^{-1}$ ($E = 0,325 \text{ V vs. ECS}$, $f = 32,15 \text{ Hz}$, $T = 5^\circ\text{C}$)

Pour l'ADN avec lésion les résultats sont donnés sur la Figure 61.

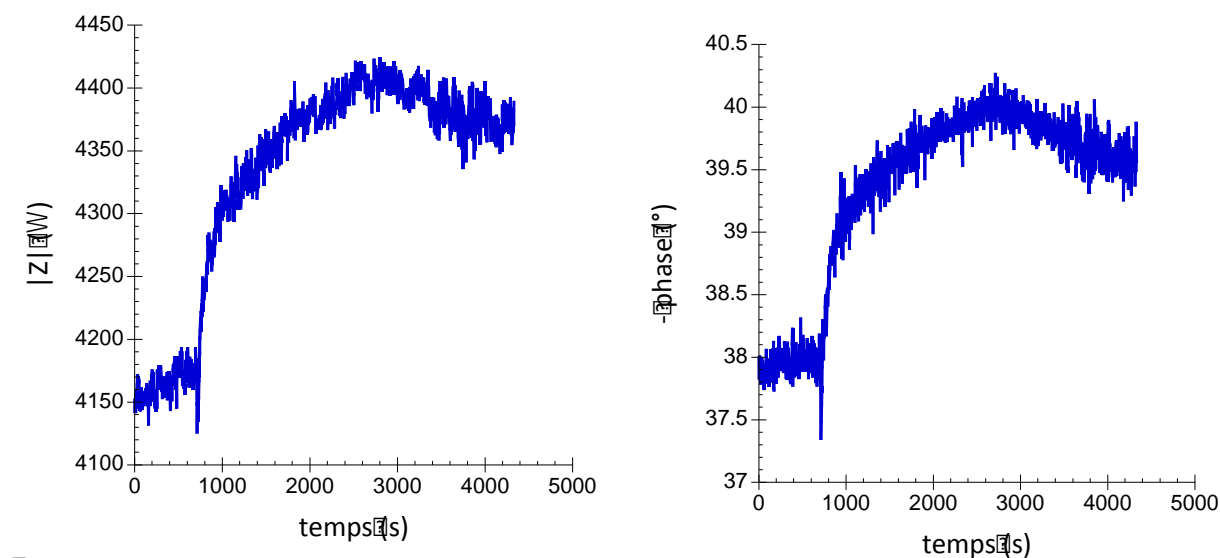


Figure 61. Mesures de chrono-impédancemétrie réalisées avec une électrode de poly-(pyrrole-NTA) fonctionnalisée avec ECS, $f = 32,15 \text{ Hz}$, $T = 5^\circ\text{C}$)

La concentration en ADN est la même que pour la Figure 60. Comme dans le cas de l'ADN sans lésion, après l'injection, on observe une augmentation du module de l'impédance et du déphasage. Par comparaison entre les deux résultats, on observe tout d'abord que la variation d'impédance est plus faible dans le cas de l'ADN avec lésion. De plus, avec lésion, au bout de 40 minutes, on observe une légère diminution de l'impédance qui pourrait signifier la fin de la coupure de l'ADN.

Les résultats de cette partie sont à prendre aux conditionnels car ils ont été très difficiles à obtenir et à reproduire. Si cela se confirme, la chrono-impédancemétrie permettra de faire la différence entre un ADN sans lésion d'un ADN avec lésion

V. Conclusions et perspectives

Dans ce chapitre, nous avons décrit la mise au point d'un biocapteur de lésions de l'ADN en immobilisant la Fpg sur des électrodes modifiées par un polymère électrogénéré portant des fonctions NTA. Nous avons montré l'importance de la position du tag histidine (en position C terminal ou N terminal) sur la réponse impédancemétrique en l'absence et en présence d'ADN. Après l'optimisation des conditions de chacune des étapes de fabrication du biocapteur, nous avons montré les différences de comportement de la bioélectrode en présence d'un ADN sain et en présence d'un ADN lésé. Cela reste un travail préliminaire. Ces résultats devront être reproduits avant de conclure définitivement que la chrono-impédancemétrie permet de différencier un ADN lésé d'un ADN sain.

Pour confirmer les études qui ont été réalisées en chrono-impédancemétrie, il sera intéressant d'utiliser la technique de SPR (Surface Plasmon Resonance) pour montrer l'interaction ADN/Fpg ce que nous n'avons pas eu le temps de faire. Avec cette technique, il a déjà été possible de montrer l'immobilisation de la protéine Fpg à la surface du poly-(pyrrole-NTA).

VI. Bibliographie

- [1] J. H. Houtgraaf, J. Versmissen, W. J. van der Giessen, *Cardiovasc. Revasc. Med.* **2006**, 7, 165–172.
- [2] S. Boiteux, E. Gajewski, J. Laval, M. Dizdaroglu, *Biochemistry (Mosc.)* **1992**, 31, 106–110.
- [3] M. D. Evans, M. Dizdaroglu, M. S. Cooke, *Mutat. Res. Mutat. Res.* **2004**, 567, 1–61.
- [4] M. Dizdaroglu, *Cancer Lett.* **2012**, 327, 26–47.
- [5] S. S. Wallace, *Free Radic. Biol. Med.* **2002**, 33, 1–14.
- [6] J. Tchou, H. Kasai, S. Shibutani, M. H. Chung, J. Laval, A. P. Grollman, S. Nishimura, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1991**, 88, 4690–4694.
- [7] J. Zálešák, M. Lourdun, L. Krejčí, J.-F. Constant, M. Jourdan, *J. Mol. Biol.* **2014**, 426, 1524–1538.
- [8] B. Alberts, D. Bray, K. Hopkin, A. Johnson, J. Lewis, M. Raff, K. Roberts, P. Walter, *Essential Cell Biology, Fourth Edition*, Garland Science, **2013**.
- [9] J. C. Fromme, A. Banerjee, G. L. Verdine, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2004**, 14, 43–49.
- [10] S. Sentürker, C. Bauche, J. Laval, M. Dizdaroglu, *Biochemistry (Mosc.)* **1999**, 38, 9435–9439.
- [11] O. D. Schärer, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2003**, 42, 2946–2974.
- [12] J. C. Fromme, A. Banerjee, S. J. Huang, G. L. Verdine, *Nature* **2004**, 427, 652–656.
- [13] K. Roszkowski, W. Jozwicki, P. Blaszczyk, A. Mucha-Malecka, A. Siomek, *Med. Sci. Monit.* **2011**, 17, CR329–CR333.
- [14] D. C. Malins, K. E. Hellström, K. M. Anderson, P. M. Johnson, M. A. Vinson, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2002**, 99, 5937–5941.
- [15] A. R. Collins, J. Cadet, L. Möller, H. E. Poulsen, J. Viña, *Arch. Biochem. Biophys.* **2004**, 423, 57–65.
- [16] O. Nakagawa, S. Ono, Z. Li, A. Tsujimoto, S. Sasaki, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, 47, 8983–8983.
- [17] T. Nasr, Z. Li, O. Nakagawa, Y. Taniguchi, S. Ono, S. Sasaki, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2009**, 19, 727–730.
- [18] Y. Taniguchi, R. Kawaguchi, S. Sasaki, *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, 133, 7272–7275.
- [19] L. Xue, M. M. Greenberg, *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, 129, 7010–7011.
- [20] L. Dennany, R. J. Forster, B. White, M. Smyth, J. F. Rusling, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, 126, 8835–8841.
- [21] A. Mugweru, B. Wang, J. Rusling, *Anal. Chem.* **2004**, 76, 5557–5563.
- [22] B. Zhang, L.-H. Guo, M. M. Greenberg, *Anal. Chem.* **2012**, 84, 6048–6053.
- [23] N. Haddour, S. Cosnier, C. Gondran, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, 127, 5752–5753.
- [24] J. Baur, C. Gondran, M. Holzinger, E. Defrancq, H. Perrot, S. Cosnier, *Anal. Chem.* **2010**, 82, 1066–1072.
- [25] H. Xu, K. Gorgy, C. Gondran, A. Le Goff, N. Spinelli, C. Lopez, E. Defrancq, S. Cosnier, *Biosens. Bioelectron.* **2013**, 41, 90–95.
- [26] D. D. Macdonald, *Electrochimica Acta* **2006**, 51, 1376–1388.
- [27] J. R. Macdonald, W. B. Johnson, in *Impedance Spectrosc.* (Eds.: E.B.S.A. Engineer, J. Rossdonald), John Wiley & Sons, Inc., **2005**.
- [28] F. Lisdat, D. Schäfer, *Anal. Bioanal. Chem.* **2008**, 391, 1555–1567.
- [29] M. Singh, M. Holzinger, M. Tabrizian, S. Winters, N. C. Berner, S. Cosnier, G. S. Duesberg, *J. Am. Chem. Soc.* **2015**, 137, 2800–2803.
- [30] W. Hu, C. M. Li, H. Dong, *Anal. Chim. Acta* **2008**, 630, 67–74.

- [31] C. Gondran, M.-P. Dubois, S. Fort, S. Cosnier, S. Szunerits, *The Analyst* **2008**, *133*, 206.
- [32] E. Wijaya, C. Lenaerts, S. Maricot, J. Hastanin, S. Habraken, J.-P. Vilcot, R. Boukherroub, S. Szunerits, *Curr. Opin. Solid State Mater. Sci.* **2011**, *15*, 208–224.
- [33] A. Badia, **2007**.
- [34] E. Kretschmann, *Z. Für Phys.* **1971**, *241*, 313–324.
- [35] A. F. Diaz, J. Castillo, K. K. Kanazawa, J. A. Logan, M. Salmon, O. Fajardo, *J. Electroanal. Chem. Interfacial Electrochem.* **1982**, *133*, 233–239.
- [36] A. Deronzier, J. C. Moutet, *Acc. Chem. Res.* **1989**, *22*, 249–255.
- [37] G. Sabouraud, S. Sadki, N. Brodie, *Chem. Soc. Rev.* **2000**, *29*, 283–293.
- [38] O. P. Edupuganti, Y. Singh, E. Defrancq, P. Dumy, *Chem. – Eur. J.* **2004**, *10*, 5988–5995.
- [39] S. Szunerits, X. Castel, R. Boukherroub, *J. Phys. Chem. C* **2008**, *112*, 15813–15817.

VII. Experimental part

Chemicals

Na_2HPO_4 , NaH_2PO_4 , H_2SO_4 and hydroquinone were purchased from Sigma-Aldrich, France. AgNO_3 , CuCl_2 and acetonitrile were purchased from Prolabo (VWR International). Lithium perchlorate (LiClO_4) from Fluka and NaCl from Carlo Erba (France). Reagents and chemicals were used as received unless otherwise mentioned. Pyrrole-nitrilotriacetic acid (NTA) was synthesized according to previously described procedure^[23].

Cleaning of electrodes

The glassy carbon electrodes are cleaned with alumin 0.3μ . Then the electrodes are washed with water, ethanol and acetone. The cleaning of the electrode are finished by cycling 25 times in H_2SO_4 solution (0.5 mol.L^{-1}) between -0.3 V and -1.7 V vs. Ag/AgCl/KCl saturated. Finally, the glassy carbon electrodes are rinsed with distilled water.

The sensor gold are first degreased with acetone, rinsed with distilled water and dried.

Electrochemical experiments

For the characterization and the polymerization of poly(pyrrole-NTA) film, the electrochemical experiments were carried out in the three-electrode electrochemical cell using an Autolab PGSTAT 100 potentiostat. A Pt wire placed in a separated compartment was used as counter electrode, the Ag/AgNO_3 (0.01 mol.L^{-1} in LiClO_4 $0.1 \text{ mol.L}^{-1}/\text{CH}_3\text{CN}$) electrode served as reference and a glassy carbon (diameter 3 mm) electrode as working electrode. All potentials given in this work are referred to a (Ag/AgNO_3) reference electrode in acetonitrile and a saturated calomel electrode (SCE) in aqueous solutions. The experiments were conducted in anhydrous acetonitrile with 0.1 mol.L^{-1} lithium perchlorate. All the electrochemical measurement was performed using NOVA software (v.1.11.1).

Monomer characterization and pyrrole-NTA polymerization

The electrochemical characterization of the pyrrole-NTA and the poly(pyrrole)-NTA were performed in LiClO_4 0.1 mol.L^{-1} in acetonitrile.

Electropolymerization of pyrrole-NTA 5 mmol.L^{-1} in acidic medium (three equivalent) in $0.1 \text{ mol.L}^{-1} \text{ LiClO}_4 / \text{CH}_3\text{CN}$ was performed by galvanostatic method (2.5 mC.cm^{-2}) ($I = 10 \text{ }\mu\text{A}$, $t = 18 \text{ s}$) for glassy carbon electrode (diameter: 3 mm). The electropolymerization of the pyrrole-NTA (5 mmol.L^{-1}) was performed on gold sensor BK7 (diameter 14 mm - Kinetic Evaluation Instrument, The Netherlands)) by chronoamperometry method ($Q=2.5 \text{ mC.cm}^{-2}$, $E = 0.85 \text{ V vs. Ag/AgNO}_3$).

DNA and FPG protein

The different oligonucleotides sequences (5' G ATG AAT TCA CGC TCG CAC GCA TCG CTG GTA 3' - 3' C TAC TTA AGT GCG AGC GTG CGT AGC GAC CAT 5' for DNA without damage and 5' G ATG AAT TCA CGC TCX CAC GCA TCG CTG GTA 3' - 3' C TAC TTA AGT GC⁸G AGG GTG CGT AGC GAC CAT 5' for damaged DNA) were prepared on a DNA synthesizer (ABI 3400).^[38]

Impedance measurements

The electrochemical impedance measurements were performed by immersing the electrode into phosphate buffer ($50 \text{ mmol.L}^{-1} \text{ pH}7 + 100 \text{ mmol.L}^{-1} \text{ NaCl}$) containing hydroquinone (2 mmol.L^{-1}) as a redox probe. A Rotating Disk Electrode (RDE) with glassy carbon electrode ($\varnothing = 3 \text{ mm}$) from Autolab was used for the experiment with a rotation of $1000 \text{ tour.min}^{-1}$.

The frequency sweep was from $50,000 \text{ Hz}$ to 0.01 Hz at a potential of 0.325 V/SCE with an AC amplitude of 10 mV rms , at room temperature. A ZView software (Scribner Associates Inc.) was used to simulate the data based on an appropriate equivalent electrical circuit.

The time-scan impedance was carried out by applied a single frequency $32,15 \text{ Hz}$ at a potential at 0.325 V vs. SCE at 5°C .

SPR measurements

The SPR measurement was performed using a Springle Instrument (Kinetic Evaluation Instrument, The Netherlands). The instrument is equipped with an electrochemical open cell system of $20\text{-}150 \text{ }\mu\text{L}$ sample volume where a Ag/AgCl pseudoreference electrode, a platinum counter electrode, and a fixed contact point to the conducting layer of the sensor chip are incorporated. The gold electrode are available commercially (BK7 – refractive index $n = 1.52$).

The active electrode surface is 0.07 cm^2 . For the SPR measurements, a polarized laser light ($\lambda = 670\text{ nm}$) comes directly to the bottom side of the sensor disk via a hemispheric lens placed on a prism and the reflected light is detected by using a photodiode. The angle of incidence is varied using a vibrating mirror with a frequency of 44 Hz. ^[39]

This kind of device can performed SPR and electrochemical measurements simultaneously.

Biosensor elaboration

After polymerization, the coordination of Cu^{2+} ions within the poly(pyrrole-NTA) film was carried out by immersing the modified electrode for 20 minutes in acetate buffer solution (0.1 mol L^{-1} , pH 4.8) containing CuCl_2 ($10^{-2}\text{ mol L}^{-1}$) as previously reported^[23]. The resulting electrode was washed with a NaCl solution before incubation ($10\text{ }\mu\text{L}$) during 30 minutes with the Fpg protein wearing a histidine tag. Then, the electrode is washed in phosphate buffer during 15 minutes under stirring. This system was described elsewhere^[23,24]. After immobilization of the Fpg on the electrode surface, we incubate the modified electrode with $10\text{ }\mu\text{L}$ of DNA during 30 minutes. Then, the electrode is washed with phosphate buffer during 15 minutes under stirring. Each step of elaboration of the biosensor are characterized by impedance spectroscopy and/or by SPR.

Détection photoélectrochimique de molécule d'intérêt par intercalation d'oligonucléotides sur une électrode fonctionnalisée avec un polymère de $[Ru(bpy\text{-}pyrrole)_2(dppn)]^{2+}$

DÉTECTION PHOTOÉLECTROCHIMIQUE DE MOLÉCULE D'INTÉRÊT PAR INTERCALATION D'OLIGONUCLÉOTIDES SUR UNE ÉLECTRODE FONCTIONNALISÉE AVEC UN POLYMÈRE DE $[Ru(BPY\text{-}PYRROLE)_2(DPNN)]^{2+}$ 94

I.	GÉNÉRALITÉS	97
22.	<i>Biocapteurs photoélectrochimiques à ADN.....</i>	97
23.	<i>Biocapteurs à ADN à base de métallointercalants.....</i>	100
24.	<i>Propriétés photoélectrochimiques des complexes trisbipyridines de ruthénium(II).....</i>	101
t.	Propriétés photoélectrochimiques	101
u.	Utilisation des complexes de ruthénium dans les photobiocapteurs	104
II.	ÉLECTRODES MODIFIÉES PAR UN FILM DE POLY- $[Ru(BPY\text{-}PYRROLE)_2(DPNN)]^{2+}$	106
1.	<i>Synthèse du complexe $[Ru(bpy\text{-}pyrrole)_2(dpnn)](PF_6)_2$.....</i>	106
2.	<i>Électrochimie du monomère en solution.....</i>	108
3.	<i>Électropolymérisation du $[Ru(bpy\text{-}pyrrole)_2(dpnn)]^{2+}$</i>	109
III.	CARACTÉRISATION PHOTOÉLECTROCHIMIQUE DU FILM DE POLY- $([Ru(BPY\text{-}PYRROLE)_2(DPNN)]^{2+})$	113
1.	<i>Influence de la distance électrode – fibre optique</i>	113
2.	<i>Influence de la concentration du donneur sacrificiel sur la réponse photoélectrochimique du polymère.....</i>	114
3.	<i>Donneur ou accepteur sacrificiel ?.....</i>	115
4.	<i>Influence de l'épaisseur du polymère sur le signal photoélectrochimique du polymère.....</i>	116
IV.	ÉLABORATION D'UN PHOTOBIOCAPTEUR POUR LA DÉTECTION D'UNE SÉQUENCE SPÉCIFIQUE DU VIH	119
1.	<i>Preuve de concept</i>	120
a.	Par photoélectrochimie	120
b.	Par microscopie à fluorescence	123
2.	<i>Courbe d'étalonnage de la détection d'ADN du VIH</i>	124
a.	Première stratégie	126
b.	Seconde stratégie	127
3.	<i>Comparaison des deux courbes d'étalonnage obtenues.....</i>	128
a.	Traitement des données expérimentales par l'isotherme de Langmuir	128
b.	Traitement des données expérimentales par l'isotherme de Langmuir-Freundlich	129
4.	<i>Conclusion</i>	133
V.	ÉLABORATION D'UN PHOTOBIOCAPTEUR POUR LA DÉTECTION DE LA COCAÏNE PAR IMMOBILISATION D'UN APTAMÈRE	134
1.	<i>Aptacapteurs électrochimiques de la cocaïne.....</i>	134
2.	<i>Description et synthèse des aptamères.....</i>	136

a.	Synthèse.....	136
b.	Purification des aptamères anti-cocaïne.....	138
	Aptamère mono-fragment	138
	Aptamère double-fragments.....	139
3.	<i>Preuve de concept</i>	140
a.	Principe de l'aptacapteur	140
	Aptamère mono-fragment	140
	Aptamère double-fragment	141
b.	Optimisation des conditions de mesure du photocourant	142
	Tampon PBS (Phosphate Buffer Saline) 10^{-2} mol.L ⁻¹ pH 7,4, KCl $2,7 \cdot 10^{-3}$ mol.L ⁻¹ et de NaCl $0,137$ mol.L ⁻¹	142
	Tampon Tris-HCl $0,2$ mol.L ⁻¹ pH 7,4 contenant 2 mmol.L ⁻¹ de MgCl ₂	144
c.	Accrochage de l'aptamère sur les électrodes modifiées par le film de poly-([Ru(bpy-pyrrole) ₂ (dpnn)] ²⁺ ...	145
d.	Tests préliminaires en présence de cocaïne	147
	Avec l'aptamère mono-fragment	147
	Avec l'aptamère double-fragment	148
4.	<i>Courbe d'étalonnage de la détection de cocaïne</i>	149
a.	Détection de cocaïne en présence de $1 \mu\text{mol L}^{-1}$ d'aptamère	149
b.	Détection cocaïne en présence de $0,1 \mu\text{mol L}^{-1}$ d'aptamère	151
c.	Mesures en présence d'interférents	152
5.	<i>Comparaison des deux courbes d'étalonnage obtenues</i>	153
a.	Traitement des données expérimentales par l'isotherme de Langmuir	153
b.	Traitement des données expérimentales par l'isotherme de Langmuir-Freundlich	154
6.	<i>Conclusion</i>	158
VI.	CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES	158
VII.	BIBLIOGRAPHIE	160
VIII.	EXPERIMENTAL PART.....	163

Dans ce chapitre, nous nous proposons de développer un biocapteur photoélectrochimique avec des surfaces nanostructurées photorédox ne nécessitant ni de marquage préalable ni l'addition d'une sonde redox contrairement à d'autres techniques électrochimiques.^[1] Pour cela, un complexe de Ruthénium (II) photosensible et électroactif possédant des ligands permettant son dépôt sur électrode et des ligands permettant la reconnaissance d'oligonucléotide par intercalation a été utilisé.

Ce travail se compose de plusieurs parties. Après avoir fait quelques rappels sur les propriétés photoélectrochimiques des complexes trisbipyridine de ruthénium (II) dans une première partie, la partie II s'attache à la description, à la synthèse, et au comportement électrochimique en solution du complexe de Ruthénium (II). Après étude de l'électropolymérisation, les propriétés photoélectrochimiques des électrodes de polymère de ruthénium ont été utilisées dans la partie III pour étudier l'hybridation d'ADN sur ces surfaces photosensibles électrogénérées de Ru (II). La partie IV présente la mise au point, la preuve de concept et la conception d'un photobiocapteur d'une séquence d'acides nucléiques caractéristique du génome du VIH (Virus de l'Immunodéficience Humaine). Enfin, dans la dernière partie, nous avons étudié le comportement d'un aptamère sur ces surfaces afin d'élaborer un photoaptacapteur capable de reconnaître la cocaïne grâce à un aptamère anti-cocaïne.

I. Généralités

Grâce aux progrès qui ont été faits dans le domaine des biocapteurs durant ces dernières années, l'intégration d'oligonucléotides dans ces dispositifs a permis de détecter une grande variété de biomolécules telles que des molécules d'ADN,^[2] drogues,^[3] et protéines.^[3] Parmi toutes les méthodes de détection existantes ^[1,2,4,5], les méthodes de transduction électrochimiques présentent l'avantage d'être simples, rapides et peu coûteuses. Dans le cadre de ce travail, nous nous sommes intéressés à la transduction photoélectrochimique, qui représente une option intéressante pour le développement de nouveaux biocapteurs, pour la détection de séquence spécifique d'ADN associée à des pathologies.^[6] Alors que dans le chapitre précédent, nous avons développé des techniques impédancemétriques pour caractériser l'interaction de protéines de réparation de l'ADN avec des oligonucléotides, nous avons cherché à développer, dans ce chapitre, de nouvelles techniques photoélectrochimiques pour caractériser l'interaction de duplex d'ADN ainsi que l'interaction aptamère-cible avec des électrodes photosensibles. L'objectif est de concevoir de nouveaux types de surfaces de transduction et de construire un biocapteur à ADN du VIH et à cocaïne.

1. Biocapteurs photoélectrochimiques à ADN

La photoélectrochimie est basée sur l'irradiation d'un photosystème qui, grâce à ses propriétés rédox, va pouvoir générer un photocourant. Bien que la détection par électrochimiluminescence mette en jeu des états excités de photosystèmes et partage ainsi des similitudes avec la détection photoélectrochimique, elle ne sera pas discutée dans ce chapitre. La photoélectrochimie a pour but de s'affranchir d'une source lumineuse coûteuse et de développer de nouvelles techniques de détection. Relativement récente, cette technique est basée sur les avancées importantes dans le domaine des cellules photovoltaïques à colorants. L'excitation par une source lumineuse à une longueur d'onde bien choisie induit le passage d'une surface photosensible de l'état fondamental à un état excité. Si la surface est également modifiée par des biomolécules capables d'opérer une reconnaissance moléculaire, celle-ci induit un changement dans la séparation de charges au niveau du photosensibilisateur. L'intensité du photocourant alors généré est corrélée aux nombres de molécules cibles interagissant avec la surface de l'électrode photosensible.

L'un des premiers exemples de biocapteur photoélectrochimique a été décrit par notre équipe en 2006.^[7] Un immunocapteur a été conçu à partir d'un complexe de polypyridine de ruthénium fonctionnalisé par des groupements biotine permettant l'immobilisation de la toxine du choléra via l'interaction avidine/biotine et par des groupements pyrroles permettant l'électrogénération d'un polymère sur électrode de platine. L'interaction de la toxine avec l'anticorps anti-choléra a permis, *via* une transduction photoélectrochimique, de détecter la présence d'anticorps avec une limite de détection de l'ordre de $0,5 \mu\text{g.L}^{-1}$ (Figure 62).

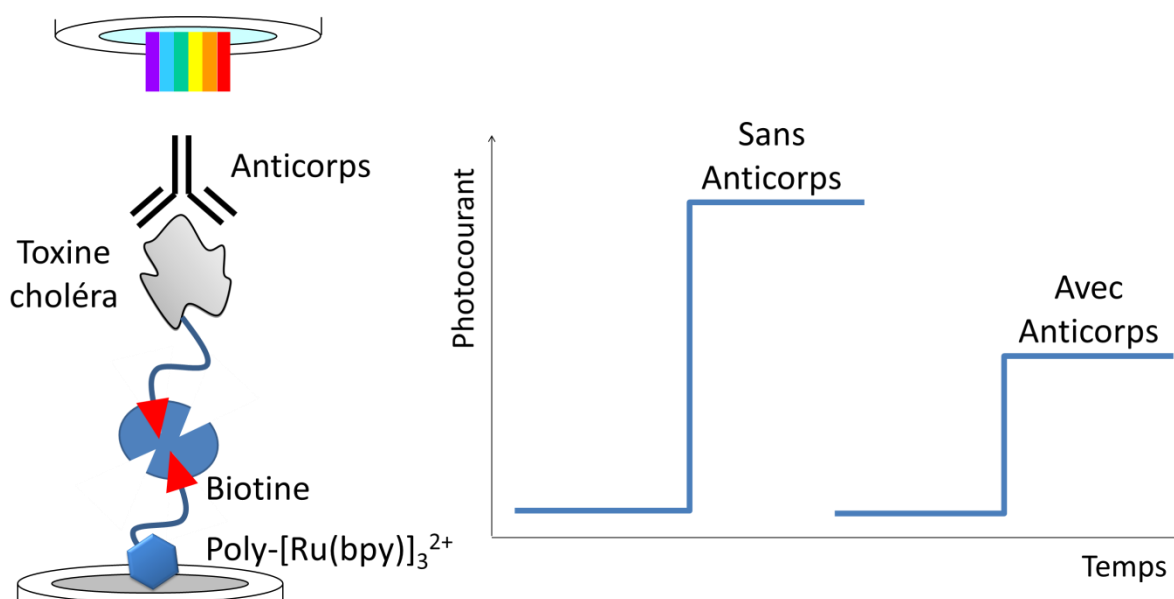


Figure 62. Principe de fonctionnement de l'immunocapteur photoélectrochimique pour la détection de la toxine du choléra selon la référence ^[7]

Cette étude montre la possibilité de détecter un événement biologique par la mesure de la variation d'un photocourant généré par irradiation dans le visible par une source lumineuse UV-visible. Par la suite, de nouveaux copolymères à base de complexes de ruthénium et de surfaces modifiées par des groupements NTA (NTA : acide NitriloTriAcétique) ont également permis de concevoir un biocapteur photoélectrochimique en immobilisant la toxine du choléra *via* une interaction NTA- Cu^{2+} - Biotine (Figure 63A). Par la même approche, le laboratoire a aussi immobilisé l'aptamère anti-thrombine ce qui a permis la détection de la thrombine avec une limite de détection de $1 \times 10^{-13} \text{ mol L}^{-1}$ (Figure 63B).^[8]

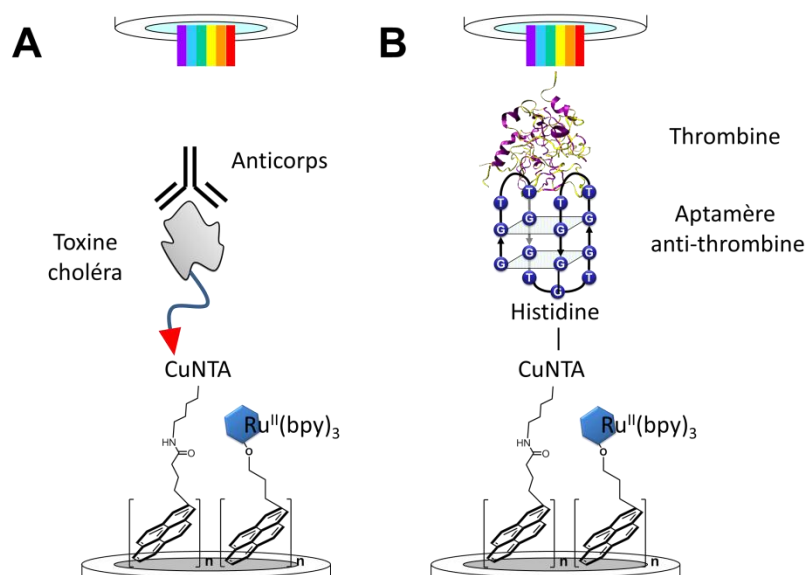


Figure 63. Principes des biocapteurs photoélectrochimiques de la référence ^[8] pour la détection (A). de la toxine du choléra *via* un anticorps anti-toxine du choléra et (B). de la thrombine *via* un aptamère anti-thrombine.

D'autres exemples de biocapteurs photoélectrochimiques ont fait intervenir d'autres types de surfaces transductrices, en particulier à base de nanoparticules semi-conductrices (appelées également quantum dots ou QDs). La Figure 64 montre deux exemples de biocapteurs à ADN utilisant des quantum dots.

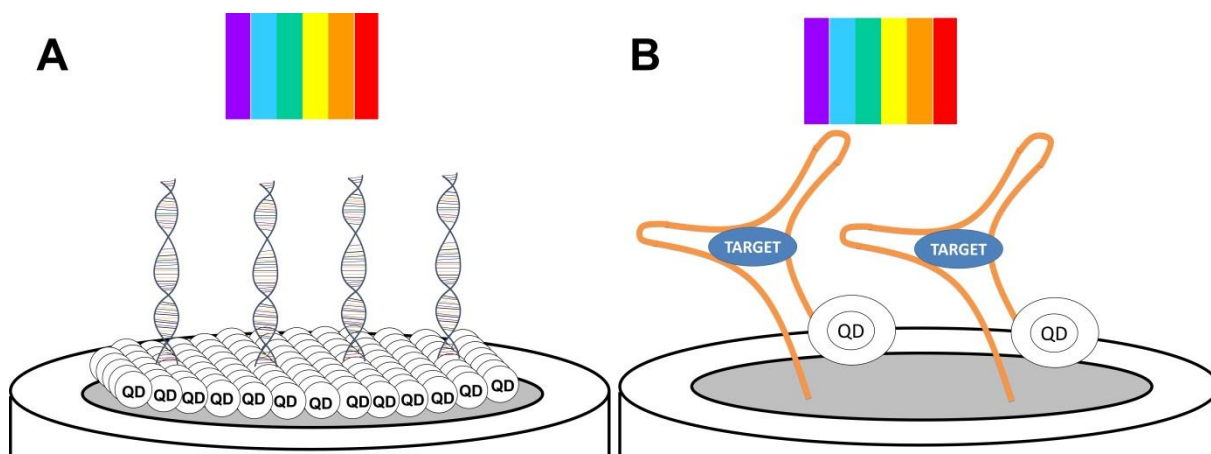


Figure 64. Schéma de principe de biocapteurs basés sur la fonctionnalisation (A) d'électrodes ou (B) d'aptamères pour la conception de biocapteurs photoélectrochimiques.(d'après les références ^[6,9,10])

La Figure 64A illustre le principe de fonctionnalisation d'une surface avec des QDs pour permettre l'immobilisation d'ADN sonde. La reconnaissance entre l'ADN sonde et l'ADN cible est détectée par photoélectrochimie.^[11-13] La Figure 64B montre que des QDs peuvent être utilisés comme marqueur sur des oligonucléotides tels que des aptamères pour la

fabrication d'aptacapteurs photoélectrochimiques.^[10] Ainsi lorsque l'aptamère aura reconnu sa cible, celui-ci va changer de conformation, rapprochant le quantum dots de la surface permettant la détection photoélectrochimique de la cible.

2. Biocapteurs à ADN à base de métallointercalants

Une grande partie des biocapteurs photoélectrochimiques à ADN sont élaborés à partir de complexes dérivés de poly-bipyridines de ruthénium(II) qui servent de marqueur photoélectrochimiques^[14–18] et dont les structures sont présentées Figure 65. Ces complexes de ruthénium sont coordonnés avec un ligand aromatique plan dérivé de phénazine tel que les ligands dppz (dipyrido[3,2-a:2', 3' -c]phenazine)^[16,19–21] et dppn (benzo[i]dipyrido-[3,2-a:2'.3'-c]phenazine)^[22–24] et de deux autres ligands tels que des bipyridines (bpy : 2,2'-bipyridine) ou des phénathrolines (phen : 1,10-phenanthroline).^[25]

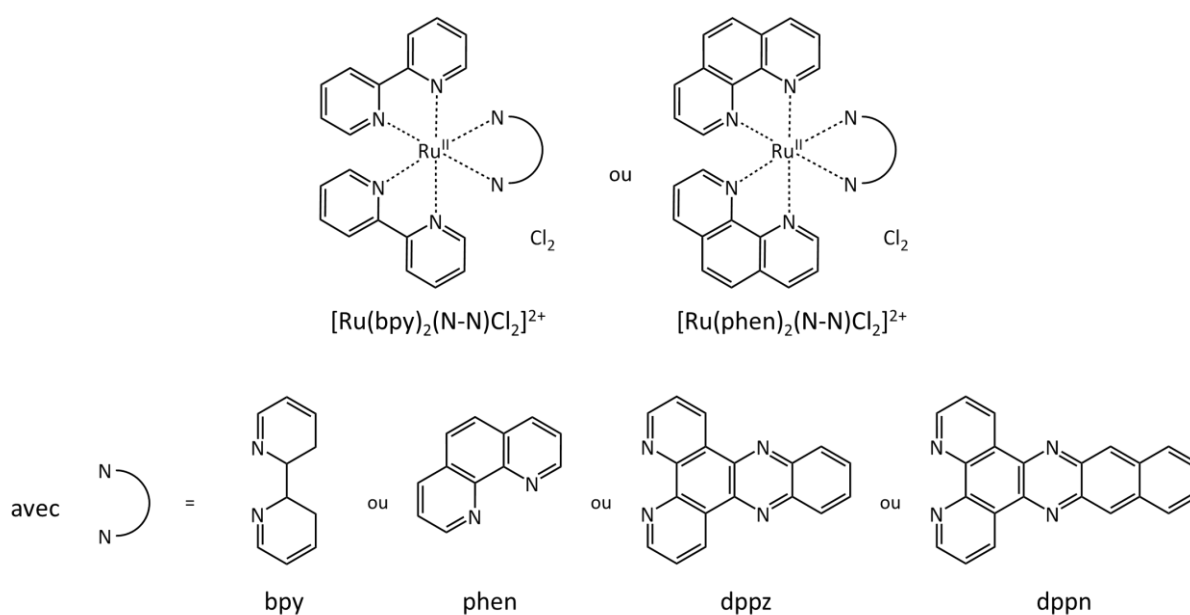


Figure 65. Structures des dérivés de ruthénium(II) utilisés en photoélectrochimie pour la détection d'oligonucléotides

Les ligands dppz et dppn sont appelés des intercalants puisqu'ils possèdent la particularité de s'insérer de façon parallèle et stable entre deux paires de bases du petit sillon de la double-hélice d'ADN grâce à des interactions π et électrostatiques.^[26,27] Ces interactions ne modifient pas de façon notable la structure de la double-hélice d'ADN^[27] mais permettent la détection photoélectrochimique d'ADN hybridé.^[25] C'est sur ce principe que les biocapteurs photoélectrochimiques sont élaborés.

Pour élaborer ce type de biocapteur dont le principe est illustré Figure 66, l'ADN sonde est immobilisé sur une électrode. Ensuite, cette électrode est incubée dans une solution d'ADN cible, dont la séquence est complémentaire à celle de l'ADN sonde. Ainsi des duplex d'ADN sont formés sur l'électrode. Afin de détecter ces duplex formés, l'électrode est incubée avec une sonde rédox telle que le $[\text{Ru}(\text{bpy})_2\text{dppz}]^{2+}$ en solution qui va s'intercaler dans les sillons des duplex d'ADN. Une fois l'électrode rincée, la transduction du signal s'effectue par irradiation de la surface de l'électrode avec la lumière visible.^[5,14,28] Le photocourant mesuré est corrélé à la concentration de duplex d'ADN formé.

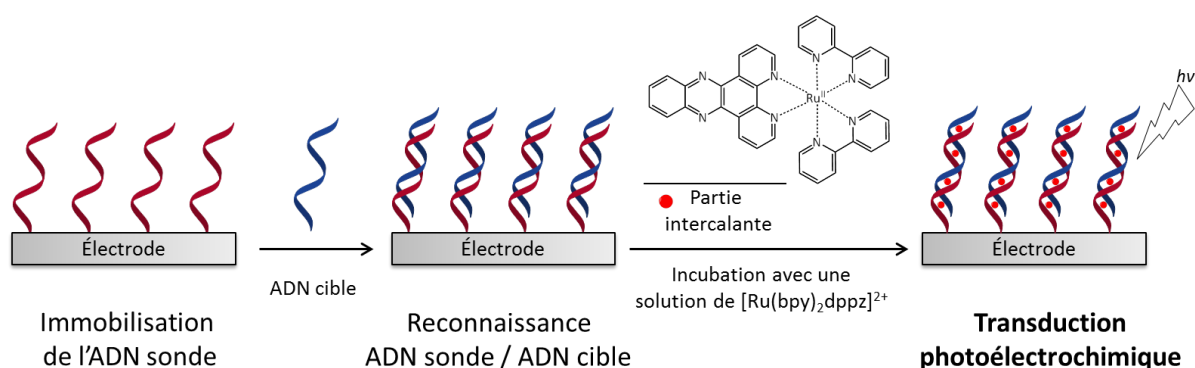


Figure 66. Principe d'un biocapteur électrochimique pour la détection d'ADN en présence d'un métallocomplexe intercalant : le $[\text{Ru}(\text{bpy})_2\text{dppz}]^{2+}$ (adapté des références ^[14,29]).

De plus, la modification des propriétés photoélectrochimiques de ce type de complexe par l'ADN est également étudiée, notamment pour la génération d'oxygène singulet^[23] et le photoclivage d'ADN.^[22]

3. Propriétés photoélectrochimiques des complexes trisbipyridines de ruthénium(II)

a. Propriétés photoélectrochimiques

Pour réaliser des mesures de photoélectrochimie sur des surfaces photosensibles, le système de mesure doit être composé d'une lampe avec un jeu de filtres permettant de sélectionner la longueur d'onde, d'une cellule et de trois électrodes (une électrode de travail fonctionnalisée avec un complexe de ruthénium (II), une électrode de référence ainsi qu'une contre-électrode) connectées à un potentiostat (Figure 67). Le potentiostat va permettre de polariser l'électrode de travail et mesurer le courant généré. Il est possible de réaliser ces mesures sous atmosphère d'argon, par exemple.

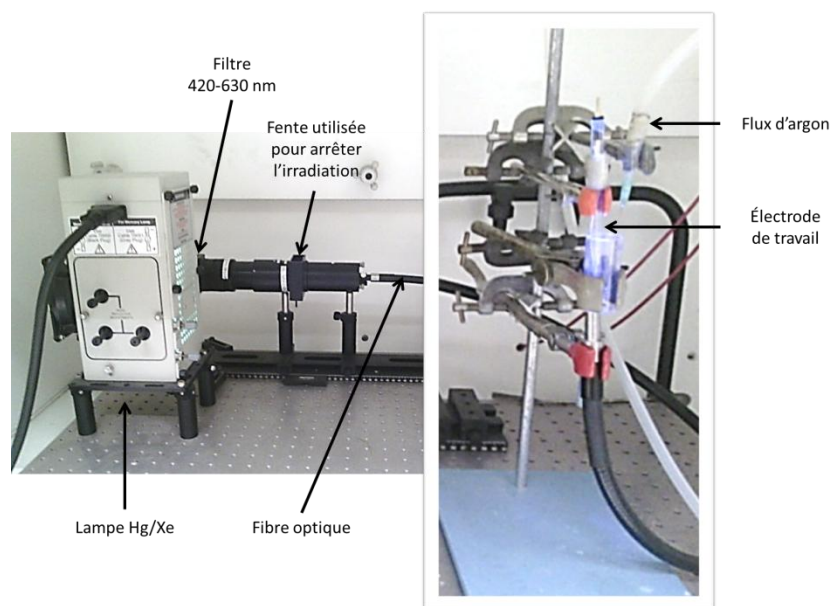


Figure 67. Montage utilisé pour réaliser les mesures de photoélectrochimie avec une lampe Hg/ Xe 250 W (Oriel) équipée de filtres permettant la sélection de la longueur d'onde. Les mesures sont réalisées en présence d'un donneur ou d'un accepteur sacrificiel.

Le complexe de ruthénium $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}$ (bpy : 2,2'-bipyridine) et ses dérivés, dont la structure est donnée Figure 68A, est l'un des complexes les plus utilisés comme photosensibilisateur, non seulement dans l'élaboration de biocapteurs photoélectrochimiques^[30], mais également dans la plupart des dispositifs moléculaires photosensibles telles que les cellules photovoltaïques à colorant. C'est pourquoi, il a été pris comme modèle pour décrire brièvement le mécanisme mis en jeu lors de la désactivation de l'état excité du complexe (généré par l'irradiation lumineuse dans le visible) en présence d'un donneur ou d'un accepteur d'électron. Lors de l'irradiation, le complexe $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}$ va absorber un photon générant l'état excité du complexe $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+*}$. Cet état excité s'oxyde ou se réduit plus facilement que le complexe pris dans son état fondamental comme le montre la Figure 68B. De plus cet état excité avec une durée de vie de l'ordre de la microseconde peut être engagé dans des réactions bimoléculaires dites de quenching par transfert d'électron.

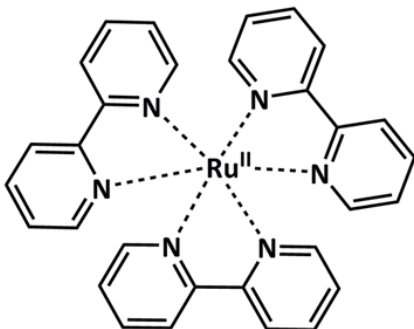
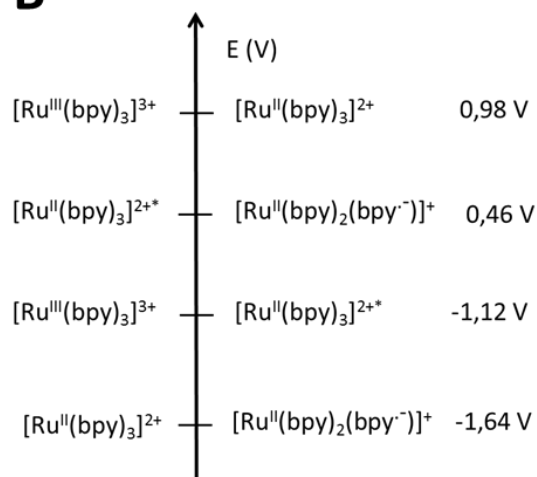
A**B**

Figure 68 : (A). Structure chimique du $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}$. **(B).** Valeur des différents potentiels rédox de l'état excité et de l'état fondamental du $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}$. Les potentiels E° de -1.12 et de 0.46 V de l'état excité sont données d'après la référence^[31]. Les potentiels de l'état fondamental correspondent aux $E_{1/2}$ mesurés sur les courbes de voltampérométrie cyclique dans $\text{CH}_3\text{CN} + \text{TBAP}$ 0,1 mol. L^{-1} . Les potentiels sont donnés par rapport à $\text{Ag}/\text{Ag}^+ 10^{-2}$ mol. L^{-1} dans $\text{CH}_3\text{CN} + \text{TBAP}$ 0,1 mol. L^{-1} .

Ainsi, la présence d'accepteur ou de donneur sacrificiel avec des potentiels judicieusement sélectionnés va permettre respectivement de réduire l'état excité du $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+*}$ en $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^+$ (Figure 69A) ou d'oxyder l'état excité en $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{3+}$ (Figure 69A). Le complexe $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}$ est ensuite régénéré grâce à un échange d'électron avec l'électrode^[32] en appliquant à l'électrode de travail un potentiel convenablement choisi. Cela engendre la production d'un signal électrique entre l'électrode de travail et la contre-électrode^[14] appelé photocourant. En présence d'un donneur sacrificiel (oxalate de sodium, ascorbate de sodium...), la valeur du photocourant est positive due à l'oxydation du $[\text{Ru}(\text{bpy})_2]^+$ photogénéré en $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}$; on parle alors de photocourant anodique (Figure 69B) alors qu'en présence d'un accepteur sacrificiel (sels de diazonium, viologènes ou sels de cobalt (III)), la valeur du photocourant est négative, due à la réduction du $[\text{Ru}(\text{bpy})_2]^{3+}$ photogénéré en $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}$; on parle alors de photocourant cathodique (Figure 69B). Des cycles lumière « on » / lumière « off » sont réalisés pendant les expériences de chronoampérométrie afin de mesurer précisément les valeurs de courant sous irradiation et leur stabilité. Le mécanisme simplifié permettant la génération de ces photocourants est présenté Figure 69A.

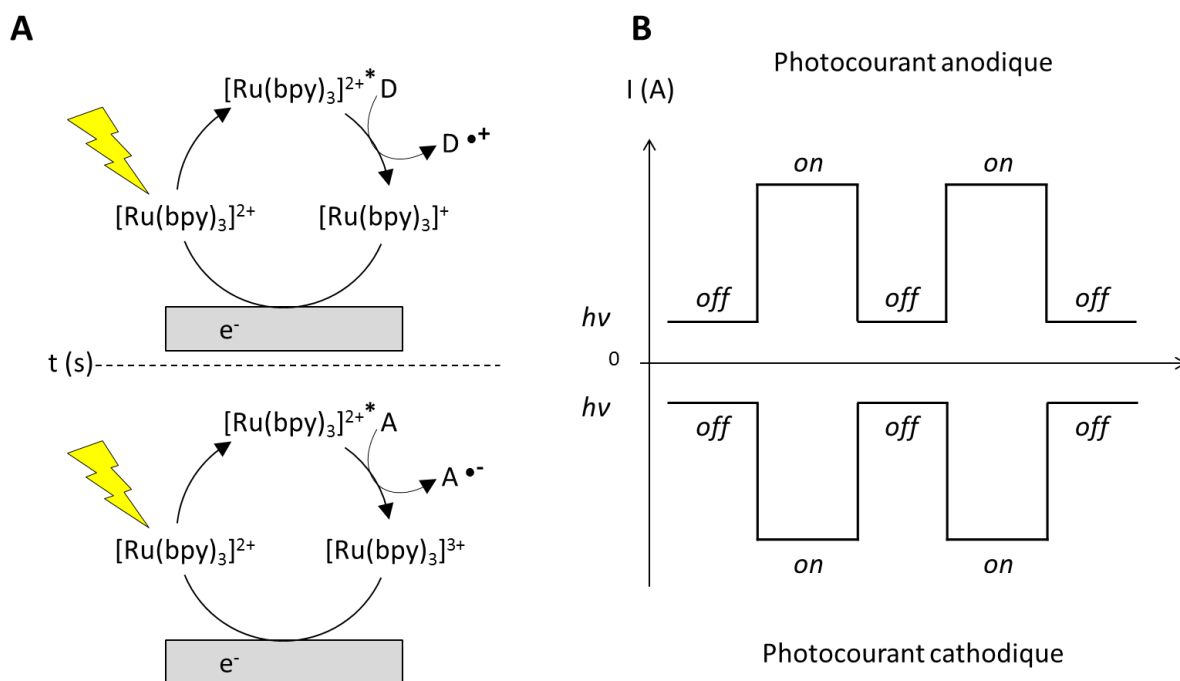


Figure 69. (A). Mécanisme simplifié de génération du photocourant anodique et cathodique du complexe $[Ru(bpy)_3]^{2+}$ en présence d'un donneur (D) ou d'un accepteur (A) sacrificiel présent dans l'électrolyte de mesure. (B). Représentation schématique du photocourant anodique ou cathodique généré suite à l'irradiation dans le domaine du visible du complexe $[Ru(bpy)_3]^{2+}$ en solution.

b. Utilisation des complexes de ruthénium dans les photobiocapteurs

Dans le cas des biocapteurs photoélectrochimiques à ADN, la reconnaissance de l'ADN avec le complexe de ruthénium se traduit par une modification des propriétés photoélectrochimiques du complexe de ruthénium modifiant ainsi le photocourant généré. Il peut s'agir d'une modification d'accès du donneur ou de l'accepteur sacrificiel aux centres métalliques ou des modifications moléculaires au niveau de la génération de l'état excité. La variation de l'intensité du photocourant généré par l'irradiation est alors corrélé aux nombres de molécules cibles interagissant à la surface de l'électrode photosensible. Les biocapteurs photoélectrochimiques à ADN peuvent générer deux types de réponses : un signal « on » ou un signal « off ».^[14] Un signal « on » correspond à une augmentation de photocourant et un signal « off » à une diminution de photocourant après la reconnaissance de l'ADN. Le type de signal photoélectrochimique généré va dépendre de la configuration du biocapteur, comme illustré Figure 70. La Figure 70A représente le principe de configuration de biocapteur permettant de générer un signal « on » tandis que la Figure 70B illustre le type de photobiocapteur générant un signal « off ».

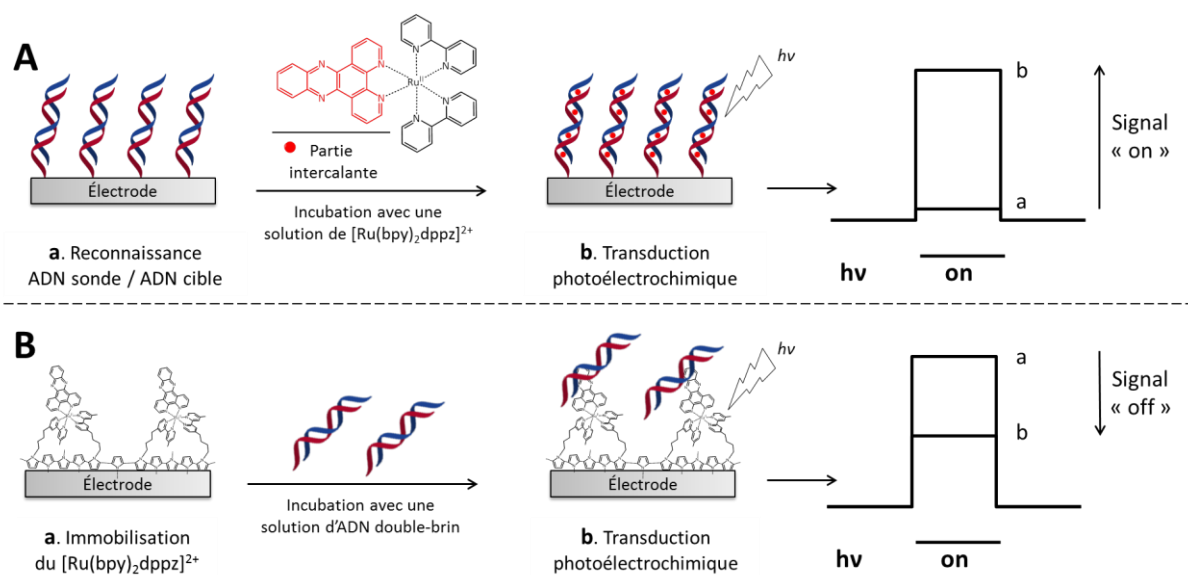


Figure 70. Biocapteurs photoélectrochimiques à ADN à base de $[\text{Ru}(\text{bpy})_2\text{dppz}]^{2+}$. (A). Le complexe $[\text{Ru}(\text{bpy})_2\text{dppz}]^{2+}$ est utilisé comme marqueur de l'hybridation de l'ADN, générant un signal « on ». (B) Le complexe de $[\text{Ru}(\text{bpy})_2\text{dppz}]^{2+}$ est immobilisé sur une électrode. La reconnaissance entre le complexe de ruthénium et l'ADN induit une diminution de photocourant donc un signal « off ».

II. Électrodes modifiées par un film de poly- $[\text{Ru}(\text{bpy-pyrrole})_2(\text{dppn})]^{2+}$

Un complexe original de Ruthénium (II) coordonné avec un ligand opérant une connexion avec les oligonucléotides a été synthétisé. Il s'agit du $[\text{Ru}(\text{bpy-pyrrole})_2\text{dppn}]^{2+}$, (bpy-pyrrole = 4-méthyl-4'-butylpyrrole-2,2'-bipyridine, dppn = benzo[i]dipyrido-[3,2-a:2'.3'-c]phénazine) représenté Figure 71. Ce complexe porte deux groupements pyrrole électropolymérisables pouvant former un film de métallopolymère photosensible et stable à la surface d'une électrode et un ligand dppn capable d'intercaler l'ADN^[22,23] pour la détection d'ADN double-brin.

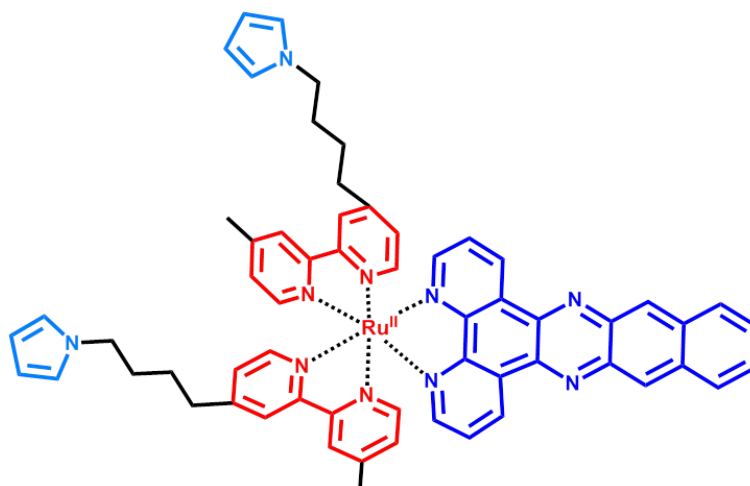


Figure 71. Structure du complexe $[\text{Ru}(\text{bpy-pyrrole})_2\text{dppn}]^{2+}$

1. Synthèse du complexe $[\text{Ru}(\text{bpy-pyrrole})_2(\text{dppn})](\text{PF}_6)_2$

Dans un premier temps, les différents ligands ont été synthétisés selon des procédures décrites dans la littérature :

- le ligand (bpy-pyrrole) 4-méthyl-4'-butylpyrrole-2,2'-bipyridine est synthétisé par formation d'un organo-lithien sur la 4,4'-diméthylbipyridine et l'ajout d'un équivalent du dérivé 1-(4-bromobutyl)-pyrrole. Après purification sur silice (dichlorométhane : acétonitrile, 9 : 1) le produit est obtenu pur sous forme de cristaux blancs avec un rendement de 25%.^[7]

- le ligand dpnn (benzo[i]dipyrido-[3,2-a:2'.3'-c]phenazine) est synthétisé par l'addition de 2,3-diaminonaphthalène sur la 1,10-phénanthroline-5,6-dione dans l'éthanol. Le produit est isolé sous la forme d'une poudre orange avec des rendements de 86%.

Le complexe intermédiaire $\text{Ru}^{\text{II}}(\text{bpy-pyrrole})_2\text{Cl}_2$ est obtenu par condensation de $\text{RuCl}_3 \cdot (\text{H}_2\text{O})_3$ et de 2 équivalents de bpy-pyrrole dans DMF à reflux pendant 1 nuit comme déjà décrit dans la littérature avec un rendement de 90%^[7].

Enfin, le complexe $[\text{Ru}(\text{bpy-pyrrole})_2(\text{dpnn})](\text{PF}_6)_2$ a été synthétisé par reflux dans l'éthylène glycol d'un mélange équimolaire du complexe de $\text{Ru}^{\text{II}}(\text{bpy-pyrrole})_2\text{Cl}_2$ et de dpnn pendant 1h. Le produit est ensuite précipité à température ambiante par ajout d'une solution aqueuse saturée en NH_4PF_6 . Le précipité obtenu est filtré, lavé à H_2O et séché à Et_2O . Le complexe sous forme de poudre orange est obtenu pur et a été caractérisé par RMN ^1H , spectrométrie de masse et par UV-visible (voir partie expérimentale page 164). Le rendement de cette dernière étape est de 73%.

La synthèse est présentée Figure 72.

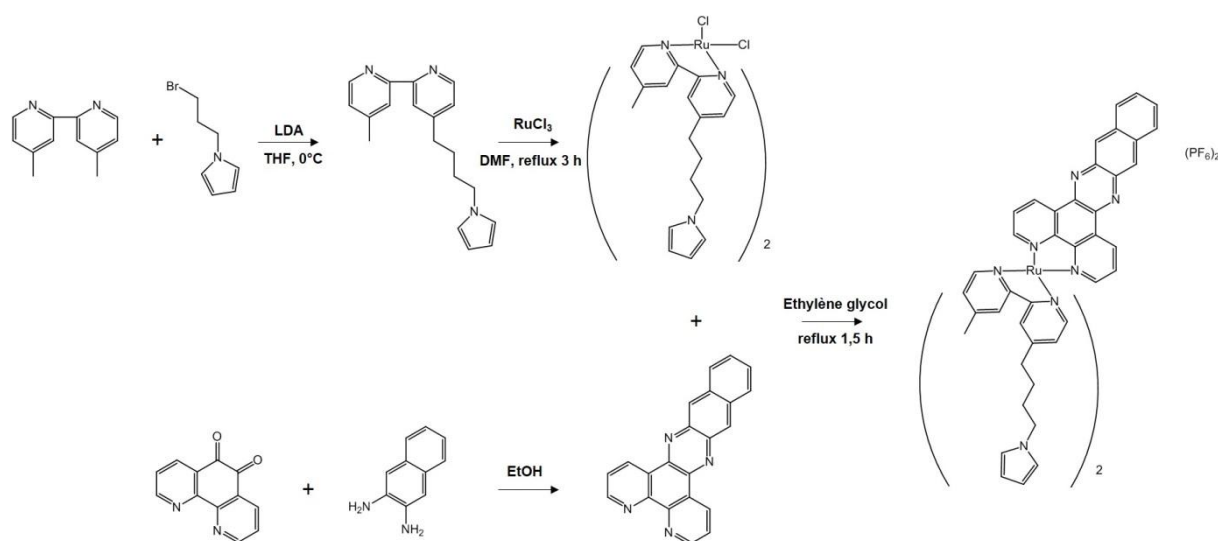


Figure 72. Schéma réactionnel des étapes permettant la synthèse du complexe $[\text{Ru}(\text{bpy-pyrrole})_2(\text{dpnn})](\text{PF}_6)_2$

Le complexe $[\text{Ru}(\text{bpy-pyrrole})_2(\text{dpnn})]^{2+}$, représenté figure 9, constitue la base des biocapteurs que nous avons développés dans les parties IV et V. Il a été donc caractérisé par voie électrochimique en solution et après électropolymérisation de celui-ci, les propriétés photorédox ont été étudiées.

2. Électrochimie du monomère en solution

La caractérisation électrochimique du complexe $[\text{Ru}(\text{bpy-pyrrole})_2(\text{dpnn})]^{2+}$ est réalisée en boîte à gants sous argon en utilisant un système à trois électrodes comprenant : une électrode de travail en platine (\varnothing : 5 mm) , une contre-électrode constituée par une verrerie à double poreux remplie d'une solution de CH_3CN + TBAP 0,1 mol.L⁻¹ dans laquelle est placé un fil de platine. L'électrode de référence est formée par une verrerie à double poreux dont l'un des compartiments est constitué d'un fil d'argent plongé dans une solution de AgNO_3 0,01 mol.L⁻¹ dans CH_3CN + TBAP 0,1 mol.L⁻¹ séparé par un poreux de l'autre compartiment rempli avec une solution de CH_3CN + TBAP 0,1 mol.L⁻¹. Cette référence sera noté Ag^+/Ag dans la suite du texte.

La caractérisation du monomère (0,5 mmol.L⁻¹) a été réalisée par voltampérométrie cyclique, dans une solution de CH_3CN + TBAP 0,1 mol.L⁻¹. Le voltampérogramme obtenu est présenté Figure 73.

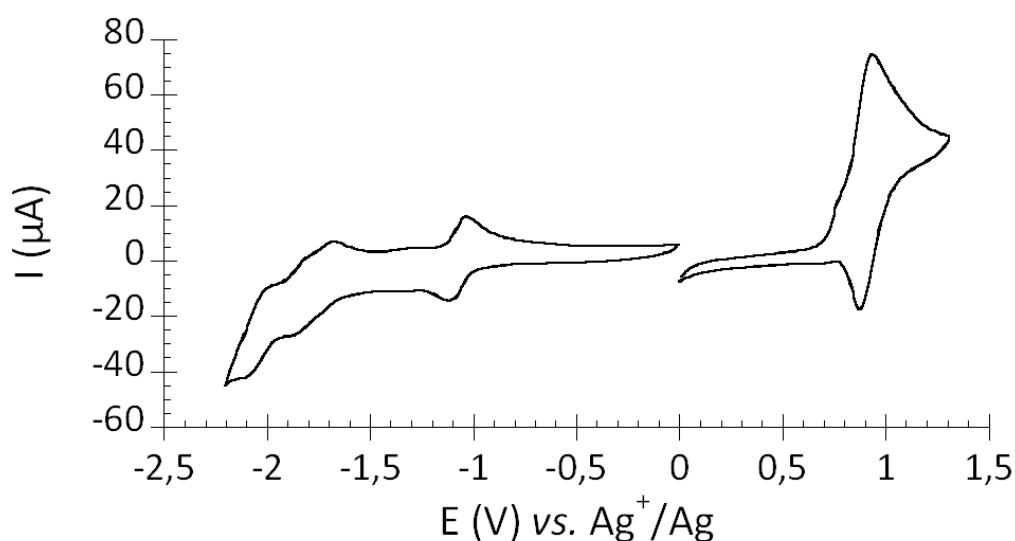


Figure 73. Voltampérogramme du monomère $[\text{Ru}(\text{bpy-pyrrole})_2(\text{dpnn})]^{2+}$ (0,5 mmol.L⁻¹) dans une solution de CH_3CN + TBAP 0,1 mol.L⁻¹ sur une électrode de platine (\varnothing = 5 mm), v_b = 100 mV.s⁻¹. Référence utilisée : Ag^+/Ag 10⁻² mol.L⁻¹ dans CH_3CN + TBAP 0,1 mol.L⁻¹.

Dans la région des potentiels négatifs, le voltampérogramme présente trois pics de réductions réversibles à des potentiels $E_{1/2}$ de -1,02 ; -1,68 et -2,01 V correspondant respectivement à la réduction monoélectronique du ligand dpnn et aux deux réductions monoélectroniques centrées sur les ligands bipyridines. L'épaule détecté à -1,50 V peut être attribué à la seconde réduction du ligand dpnn^[24]. En balayant en oxydation entre 0,0 et

1,3 V vs. Ag^+/Ag , on note la présence d'un pic irréversible à un potentiel de pic $E_{\text{pa}} = 0,76$ V correspondant à l'oxydation irréversible des deux groupements pyrroles. Il est suivi par un pic réversible à $E_{1/2} = +0,92$ V correspondant à la transition $\text{Ru}^{\text{III}} / \text{Ru}^{\text{II}}$.

3. Électropolymérisation du $[\text{Ru}(\text{bpy-pyrrole})_2(\text{dpnn})]^{2+}$

L'électropolymérisation du complexe de $[\text{Ru}(\text{bpy-pyrrole})_2(\text{dpnn})]^{2+}$ ($0,5 \text{ mmol.L}^{-1}$) est effectuée dans une solution de $\text{CH}_3\text{CN} + \text{TBAP}$ $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$ sur électrode de platine de 5 mm de diamètre, en boîte à gants sous atmosphère d'argon. Dans un premier temps, le complexe de $[\text{Ru}(\text{bpy-pyrrole})_2(\text{dpnn})]^{2+}$ est électrodéposé par vingt balayages successifs en potentiel de 0,0 à 1,3 V vs. Ag^+/Ag à une vitesse de 100 mV.s^{-1} afin de visualiser la formation du polymère. La formation du film de polymère électrogénéré à la surface de l'électrode est mise en évidence par l'augmentation de l'intensité des signaux relatifs au couple rédox $\text{Ru}^{\text{III}}/\text{Ru}^{\text{II}}$ à $E_{1/2} = 0,92$ V, comme l'atteste le voltampérogramme (Figure 74), indiquant la croissance du film électrodéposé.

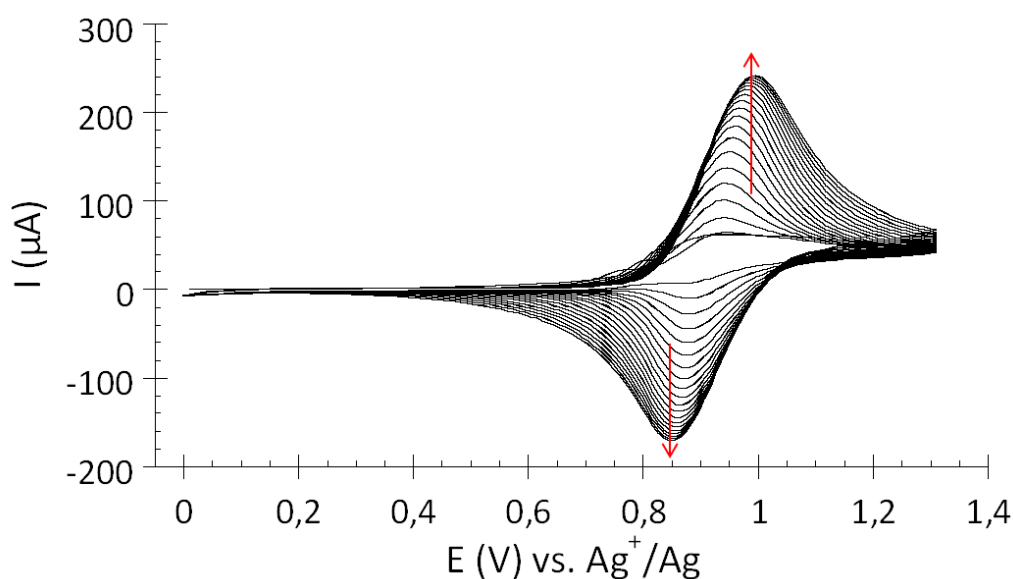


Figure 74. Voltampérogramme représentant l'électropolymérisation par voltammétrie cyclique de $[\text{Ru}(\text{bpy-pyrrole})_2(\text{dpnn})]^{2+}$ ($0,5 \text{ mmol.L}^{-1}$) dans une solution de $\text{CH}_3\text{CN} + \text{TBAP}$ $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$ sur une électrode de platine ($\varnothing = 5 \text{ mm}$). 20 scans entre 0 et +1,30 V vs. Ag^+/Ag , $\nu = 100 \text{ mV.s}^{-1}$.

Il est à noter que la polymérisation de ce complexe métallique s'effectuera dans la suite de ce chapitre entre 0,00 V et 0,75 V vs. Ag^+/Ag afin d'éviter la suroxydation du poly-(pyrrole) qui pourrait entraîner une perte de conductivité de celui-ci. La valeur de + 0,75 V est choisie comme borne de la gamme de potentiel pour la polymérisation car ce potentiel se trouve au pied de la vague d'oxydation du pyrrole et du ruthénium.

Afin de caractériser électrochimiquement un film de poly-[Ru(bpy-pyrrole)₂(dppn)]²⁺ formé à un potentiel évitant la suroxydation du polypyrrole, une électrode de platine est fonctionnalisée en réalisant 20 balayages successifs entre 0,00 et + 0,75 V vs. Ag⁺/Ag à 100 mV.s⁻¹ dans une solution de monomère de concentration 0,5 mol.L⁻¹ préparée dans CH₃CN + TBAP 0,1 mol.L⁻¹, en boîte à gants sous atmosphère d'argon. Après électropolymérisation, l'électrode est transférée dans une solution de CH₃CN + TBAP 0,1 mol.L⁻¹ exempte de monomère afin de vérifier la présence du film électrogénéré. Le voltampérogramme obtenu, est présenté Figure 75.

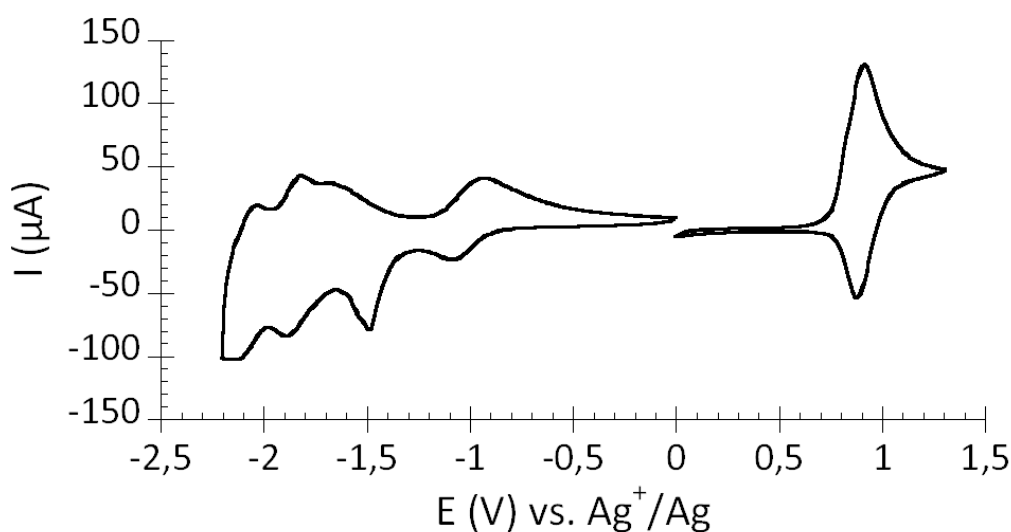


Figure 75. Caractérisation par voltampérométrie cyclique de l'électrode de platine fonctionnalisée avec le polymère de [Ru(bpy-pyrrole)₂(dppn)]²⁺ formé par 20 balayages successifs entre 0,00 et +0,75 V vs. Ag⁺/Ag. $v_b = 100 \text{ mV.s}^{-1}$ dans une solution de CH₃CN + TBAP 0,1 mol.L⁻¹ exempte de monomère.

Le polymère est caractérisé par des systèmes redox détectés à des potentiels $E_{1/2}$ de + 0,92 V, - 1,03 V, - 1,80 V et - 2,01 V attribués respectivement aux systèmes redox Ru^{III}/Ru^{II}, au ligand dppn et aux deux ligands bipyridines. L'apparition de pics de réduction irréversible au pied des pics de réduction des ligands bipyridine à un potentiel de -1,48 V et de pics d'oxydation au pied des pics d'oxydation du centre Ru(II) à un potentiel de + 0,79 V sont souvent observés dans le cas de l'électrodéposition de systèmes à plusieurs centres redox et sont générés par le piégeage et la libération de charges enfouies dans le polymère et incapables de transférer leurs électrons sans passer par l'électroactivité du polymère redox.^[33] On remarque que les potentiels des systèmes réversibles présents sur le voltampérogramme représentant l'électroactivité du film de polymère sont très proches de ceux détectés sur le voltampérogramme du monomère ; ce qui permet de confirmer que

l'électropolymérisation n'a pas affecté les propriétés électrochimiques du complexe de Ru(II). Afin de confirmer l'immobilisation du polymère à la surface de l'électrode de platine, des courbes de voltampérométrie cyclique à différentes vitesses de balayages ($v_b = 10, 25, 50, 75$ et 100 mV.s^{-1}) entre 0,0 et +1,3 V sont réalisées dans une solution de $\text{CH}_3\text{CN} + \text{TBAP}$ $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$ (Figure 76A).

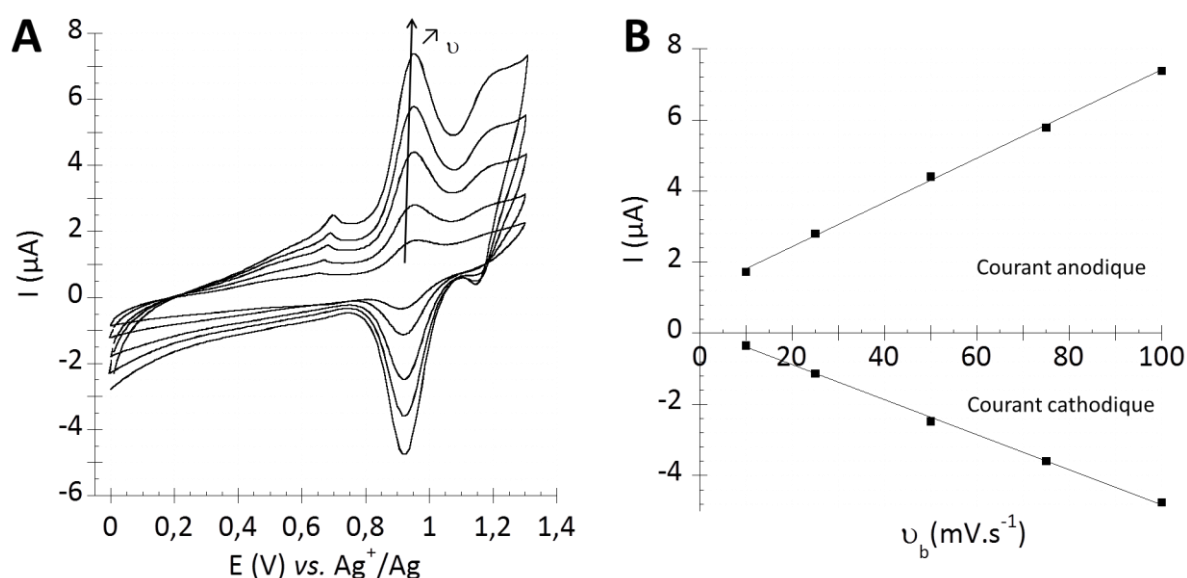


Figure 76. (A). Voltampérogramme d'une électrode Pt / poly $[\text{Ru}(\text{bpy-pyrrole})_2(\text{dppn})]^{2+}$ dans une solution de $\text{CH}_3\text{CN} + \text{TBAP}$ $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$ exempte de monomère à différentes vitesses de balayages ($v_b = 10, 25, 50, 75$ et 100 mV.s^{-1}). La polymérisation a été réalisée par voltampérométrie cyclique en réalisant 20 balayages successifs entre 0,00 et + 0,75 V vs. Ag^+/Ag dans une solution de monomère ($0,5 \text{ mmol.L}^{-1}$) dissous dans $\text{CH}_3\text{CN} + \text{TBAP}$ $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$, $v_b = 100 \text{ mV.s}^{-1}$. **(B).** Variation des intensités de courant anodique et cathodique en fonction de la vitesse de balayage v_b ($R^2 = 0,999$).

La différence de potentiel entre le potentiel de pic anodique et le potentiel de pic cathodique (ΔE_p) du système rédox du ruthénium, pour chaque vitesse de balayage testée, est proche de 0 V, traduisant le succès de l'immobilisation du complexe de Ru (II). De plus, en reportant sur un graphe les valeurs de l'intensité des courants anodiques et cathodiques en fonction de la vitesse de balayage, deux droites sont obtenues avec pour chacune un R^2 égal à 0,999 (Figure 76B). Cette variation linéaire vient aussi confirmer l'immobilisation du polymère métallique à la surface de l'électrode de platine. Le système détecté à $E_{1/2} = 1,25 \text{ V}$ pourrait être attribué à l'oxydation des phénazines ou/ et à la suroxydation de la chaîne de polymère.

Pour évaluer l'efficacité de l'électropolymérisation du $[\text{Ru}(\text{bpy-pyrrole})_2(\text{dppn})]^{2+}$ réalisée par chronoampérométrie, le rendement d'électropolymérisation η est calculé. Il est défini par le rapport entre la quantité d'espèces électroactives immobilisées $\Gamma_{\text{réel}}$ et la quantité théorique $\Gamma_{\text{théorique}}$ d'espèces immobilisées théoriquement pour un rendement d'électropolymérisation de 100 %.

La quantité d'espèces électroactives immobilisées $\Gamma_{\text{réel}}$ est déterminée à partir de la valeur de la charge obtenue suite à l'intégration du pic sous le signal redox du couple $\text{Ru}^{\text{III}} / \text{Ru}^{\text{II}}$ en considérant 1 électron. La quantité théorique d'espèce immobilisée $\Gamma_{\text{théorique}}$ pour un rendement d'électropolymérisation de 100 % est calculée à partir de la valeur de la charge utilisée lors du processus d'électropolymérisation $Q_{\text{polymérisation}}$ en considérant 5,66 électrons (2,33 électrons pour chaque pyrrole et 1 électron pour le couple redox $\text{Ru}^{\text{III}}/\text{Ru}^{\text{II}}$) consommés par molécule lors de l'électrolyse. (cf. Chapitre II – section II-3).

La charge appliquée lors de l'électropolymérisation a été étudiée afin d'observer son influence sur le rendement de polymérisation (Tableau 11). Le rendement de polymérisation a été calculé sur sept électrodes.

Tableau 11. Calcul des rendements d'électropolymérisation, moyennés sur 7 électrodes, avec une charge différente de 2,5 mC et 5 mC. L'électropolymérisation du complexe de $[\text{Ru}(\text{bpy-pyrrole})_2(\text{dppn})]^{2+}$ (0,5 mmol.L⁻¹) a été effectuée dans CH_3CN + 0,1 mol.L⁻¹ sur électrode de platine (\varnothing : 5 mm) à potentiel contrôlé ($E = 0,75$ V)

$Q_{\text{polymérisation}}$ (mC)	$\Gamma_{\text{théorique}}$ (mol.cm ⁻²)	$\Gamma_{\text{réel}}$ (mol.cm ⁻²)	η (%)
2,5	$2,33 \times 10^{-08}$	$1,55 \times 10^{-09}$	$6,0 \pm 0,5$
5	$4,66 \times 10^{-08}$	$1,21 \times 10^{-09}$	$3,0 \pm 0,2$

Lorsque la charge appliquée lors de l'électropolymérisation est de 2,5 mC, le rendement de polymérisation calculé est de $6,0 \pm 0,5$ %. Si la charge appliquée est multipliée par deux, le rendement de polymérisation est divisé par deux. On peut expliquer cette baisse de rendement par la présence de réactions secondaires au potentiel d'électrolyse ou par une limitation du transport de charge pour les films épais, ce qui empêche d'estimer l'intégralité de l'électroactivité du film à travers l'intégration de la charge sous le signal redox du couple $\text{Ru}^{\text{III}}/\text{Ru}^{\text{II}}$.^[34]

III. Caractérisation photoélectrochimique du film de poly- ([Ru(bpy-pyrrole)₂(dpnn)]²⁺)

Le spectre UV-visible du complexe de ruthénium [Ru(bpy-pyrrole)₂dpnn]²⁺ en solution à une concentration de $9,8 \times 10^{-6}$ mol.L⁻¹ dans l'acétonitrile (Figure 77) est caractérisé par une bande d'absorption centrée autour de 450 nm caractéristique du transfert de charge du métal vers le ligand (MLCT : metal-to-ligand-charge transfer).^[8,22] C'est pourquoi, les mesures de photocourants sont réalisées, par irradiation dans le domaine du visible, entre 420 et 630 nm à l'aide d'une fibre optique placée en face de la surface de l'électrode fonctionnalisée avec le métallopolymère de ruthénium.

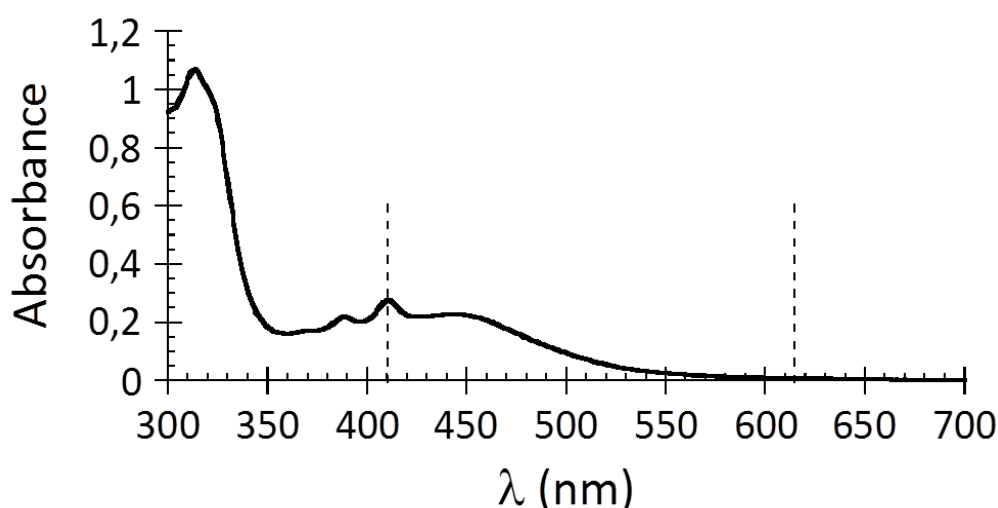


Figure 77. Spectre UV-Visible du [Ru(bpy-pyrrole)₂(dpnn)]²⁺ ($9,8 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹) dans l'acétonitrile. Les deux droites en pointillées indiquent le domaine d'irradiation (420 – 630 nm) du complexe de ruthénium utilisé en photoélectrochimie (cuve en quartz de 1 cm).

1. Influence de la distance électrode – fibre optique

L'un des paramètres qui a également été optimisé est la distance entre la surface de l'électrode et la fibre optique qui est placée contre la cellule en quartz dans laquelle la mesure s'effectue (Figure 78A). En effet, il faut que la surface de l'électrode soit assez proche de la fibre optique pour que le métallopolymère soit irradié mais il faut également que le donneur ou l'accepteur sacrificiel puisse diffuser rapidement vers la surface de l'électrode. La distance doit être fixée car elle va influencer sur la reproductibilité des mesures effectuées et sur la valeur de l'intensité du photocourant mesuré.

Une fois l'électrode recouverte d'un film de $\text{poly-}[\text{Ru}(\text{bpy-pyrrole})_2\text{dppn}]^{2+}$, plusieurs mesures de photocourant ont été réalisées dans une solution de chlorure de pentaaminechlorocobalt (III) 15 mmol.L^{-1} préparée dans une solution de tampon acétate $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$ pH = 5 en polarisant l'électrode à 0 V vs. Ag/AgCl. Trois distances ont été testées 0,0 0,5 et 2,0 cm. Les chronoampérogrammes obtenus sont présentés Figure 78B. Comme attendu, la valeur de l'intensité du photocourant diminue lorsque la distance entre l'électrode et la fibre optique augmente. La valeur de l'intensité du photocourant diminue de 33% lorsque la distance passe de 0,0 à 0,5 cm, alors qu'elle diminue de 83 % lorsque la distance passe de 0,0 cm à 2,0 cm. Donc pour la suite, un système permettant de garder une distance de 0,5 cm entre l'électrode et la cellule en quartz a été élaboré permettant ainsi une bonne reproductibilité de la puissance lumineuse reçue par l'électrode. La puissance surfacique de l'intensité lumineuse a été évaluée à $8,5 \mu\text{W.cm}^{-2}$ mesurée pour une distance de 0,5 cm à l'aide d'un mesureur de puissance (Newport, modèle 1835-C).

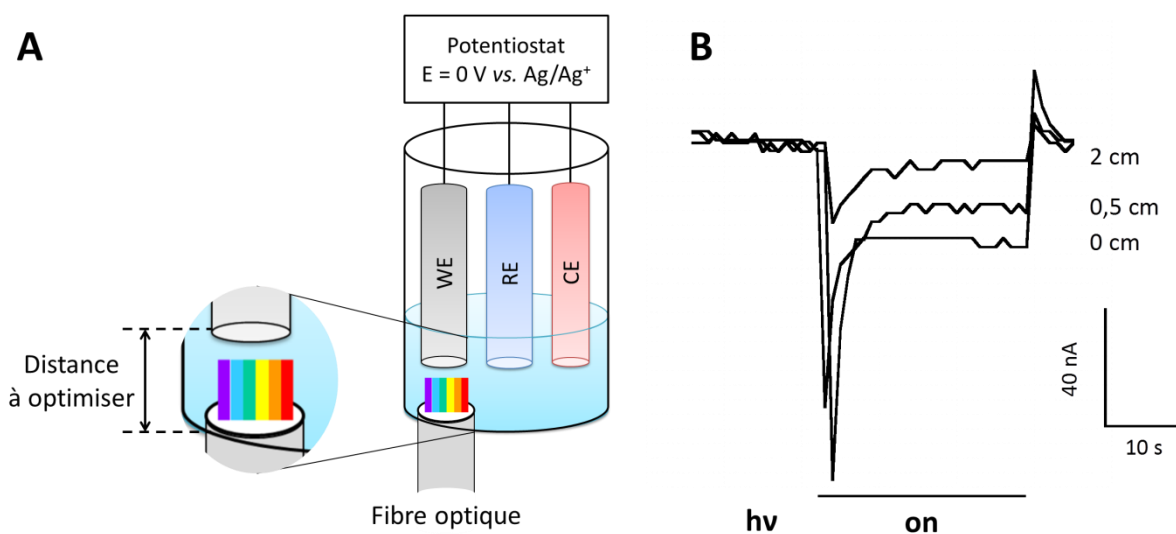


Figure 78. (A). Schéma représentant le système utilisé pour les mesures de photocourant ainsi que la distance à optimiser pour ces mesures. (B). Photocourant cathodique mesuré pour différentes distances dans du tampon acétate $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$ pH 5 contenant 15 mmol.L^{-1} de $(\text{Co(III)}(\text{NH}_3)_5 \text{ Cl})^{2+} \text{Cl}_2^-$ sur une électrode de platine ($\varnothing : 5 \text{ mm}$) modifiées avec du $\text{poly-}[\text{Ru}(\text{bpy-pyrrole})_2\text{dppn}]^{2+}$

2. Influence de la concentration du donneur sacrificiel sur la réponse photoélectrochimique du polymère

L'influence de la concentration en ascorbate de sodium sur la valeur de l'intensité du photocourant (I_{ph}) a été étudiée afin de déterminer la concentration optimale en ascorbate

de sodium. Ces mesures ont été réalisées sous flux d'argon. Les résultats obtenus sont présentés Figure 79.

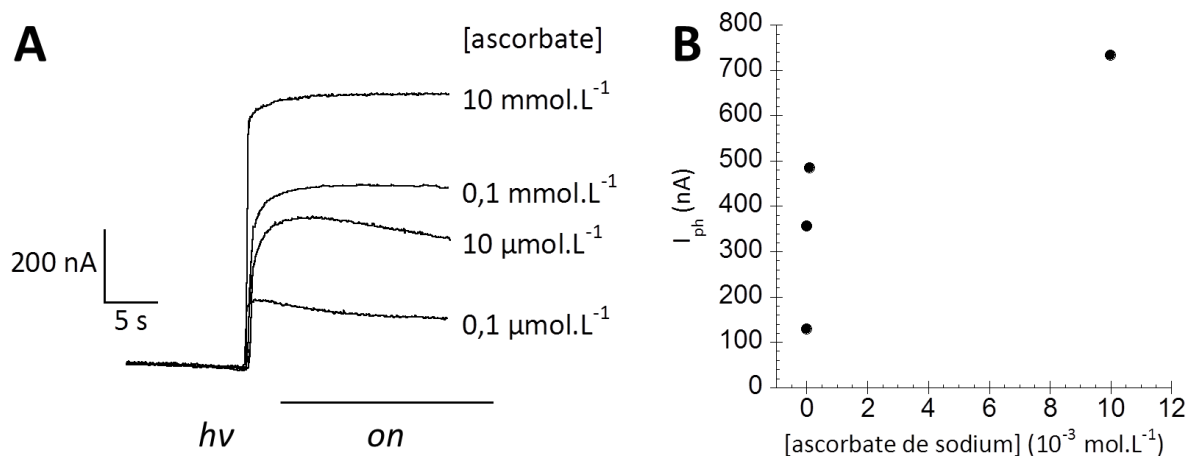


Figure 79. (A). Photocourant mesuré en présence de différentes concentrations d'ascorbate de sodium préparé dans une solution de PBS 0,01 mol L⁻¹, pH 7,4 suite à l'irradiation d'une électrode de platine modifiée avec du poly-[Ru(bpy-pyrrole)₂(dppn)]²⁺ (E = 0 V vs. Ag/AgCl). **(B).** Évolution de la valeur de l'intensité du photocourant anodique (I_{ph}) en fonction des différentes concentrations d'ascorbate de sodium.

On remarque que lorsque la concentration en ascorbate augmente, la valeur de l'intensité du photocourant augmente également pour atteindre une valeur de 734 nA pour une concentration de 10 mmol.L⁻¹. Cela peut s'expliquer par le fait que la forte concentration d'ascorbate permet une régénération plus importante du complexe [Ru^{II}(bpy)₃]²⁺ présent dans le polymère. La même expérience réalisée avec un polymère de poly-[Ru(bpy-pyrrole)₂bpy)]²⁺ pour une gamme de concentration d'ascorbate de sodium comprise entre 0,1 mmol.L⁻¹ et 30 mmol.L⁻¹, a montré que la valeur du photocourant restait identique pour une concentration d'ascorbate de sodium comprise entre 10 et 30 mmol.L⁻¹. Par conséquent, pour la suite de ces travaux, nous avons choisi une concentration d'ascorbate de sodium de 10 mmol.L⁻¹ puisque cette concentration permet d'obtenir une valeur d'intensité de courant satisfaisante de 734 nA.

3. Donneur ou accepteur sacrificiel ?

Ensuite, nous nous sommes demandés si nous devons utiliser un donneur ou un accepteur sacrificiel pour réaliser les mesures de photoélectrochimie.

La concentration de l'accepteur sacrificiel : le chlorure de pentaaminechlorocobalt avait déjà été optimisée au sein du laboratoire^[34]. Elle est de 15 mmol.L⁻¹ dans du tampon acétate 0,1 mol.L⁻¹ pH 5.

La concentration du donneur sacrificiel : l'ascorbate de sodium a été optimisée précédemment. Elle est de 10 mmol.L^{-1} dans une solution de PBS, pH 7,4.

Ainsi, nous avons comparé le photocourant obtenu avec un donneur et un accepteur sacrificiel pour un film de $\text{poly}[\text{Ru}(\text{bpy-pyrrole})_2\text{dppn}]^{2+}$. Les résultats obtenus sont présentés Figure 80.

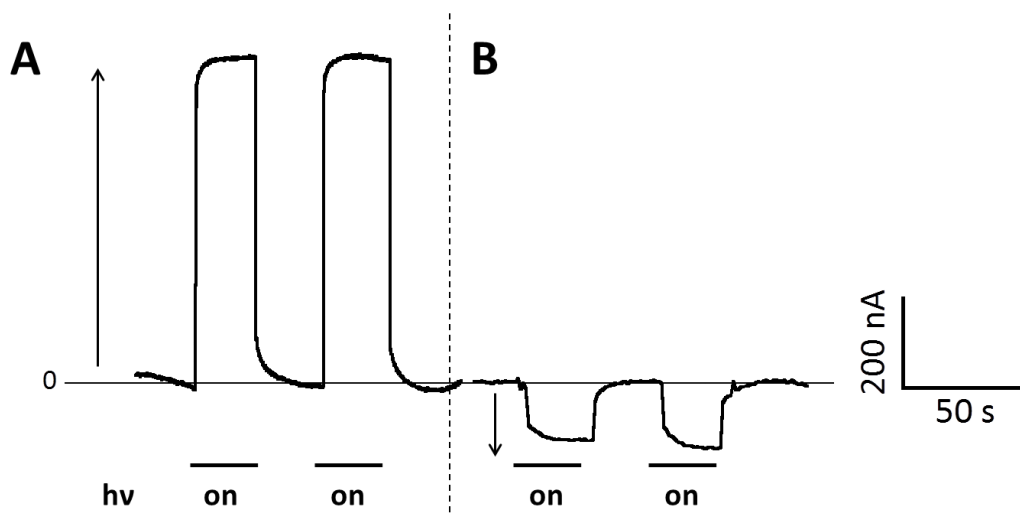


Figure 80. Comparaison des valeurs de photocourant obtenues pour un film de $\text{poly}[\text{Ru}(\text{bpy-pyrrole})_2(\text{dppn})]^{2+}$ en présence (A). d'ascorbate de sodium 10 mmol.L^{-1} préparé dans une solution de PBS pH 7,4 et (B). de chlorure de pentaaminechlorocobalt (III) 15 mmol.L^{-1} préparée dans du tampon acétate $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$ pH 5, $E = 0 \text{ V vs. Ag/AgCl}$.

Au vu des résultats obtenus avec le $\text{poly}[\text{Ru}(\text{bpy-pyrrole})_2(\text{dppn})]^{2+}$, la valeur de photocourant est plus importante en présence d'ascorbate de sodium ($I_{\text{ph}} = 740 \text{ nA}$) qu'en présence de chlorure de pentaaminechlorocobalt (III) ($I_{\text{ph}} = -147 \text{ nA}$). Cette différence peut être induite par les propriétés intrinsèques de transfert électronique entre le donneur ou l'accepteur et l'état excité du complexe du ruthénium. Pour la suite des travaux, c'est donc une concentration de 10 mmol.L^{-1} d'ascorbate de sodium à qui sera utilisée pour les mesures de photocourant.

4. Influence de l'épaisseur du polymère sur le signal photoélectrochimique du polymère

Le dernier paramètre qui a été optimisé est l'épaisseur du film de $\text{poly}[\text{Ru}(\text{bpy-pyrrole})_2(\text{dppn})]^{2+}$, le but étant d'obtenir une valeur d'intensité de photocourant maximale.

En modulant le nombre de scans (5 à 50 scans) pour électropolymériser le $[\text{Ru}(\text{bpy-pyrrole})_2(\text{dpnn})]^{2+}$, différentes électrodes sont obtenues. Le taux de recouvrement ($\Gamma_{\text{réel}}$) de

chaque polymère est calculé. Les valeurs de $\Gamma_{\text{réel}}$ calculées varient entre $2,5 \times 10^{-11}$ et $1,6 \times 10^{-08} \text{ mol.cm}^{-2}$, correspondant à 3 – 200 équivalents de monocouches de complexes à la surface de l'électrode de platine, en considérant qu'une monocouche de complexe correspond à un taux de recouvrement de surface de $8 \times 10^{-11} \text{ mol.cm}^{-2}$.^[35]

Ensuite, le comportement du poly-[Ru(bpy-pyrrole)₂(dpnn)]²⁺ lors d'irradiation dans le domaine du visible a été étudié en plaçant la fibre optique à une distance de 0,5 cm de l'électrode de platine fonctionnalisée avec le polymère, comme établi précédemment. Le photocourant anodique a été mesuré dans une solution d'ascorbate de sodium 10 mmol.L^{-1} préparé dans une solution de PBS $0,01 \text{ mol.L}^{-1}$ pH 7,4 pour les différents taux de recouvrement de surface $\Gamma_{\text{réel}}$ calculé.

La Figure 81 montre la forte dépendance qu'il y a entre la valeur du photocourant et le taux de recouvrement du Ru(II) sur la surface de l'électrode. En effet, pour des valeurs de taux de recouvrement comprises entre $2,5 \times 10^{-10} \text{ mol.cm}^{-2}$ et $4,0 \times 10^{-10} \text{ mol.cm}^{-2}$, la valeur du photocourant passe de 441 nA à 714 nA, puis diminue pour atteindre une valeur de 112 nA lorsque le taux de recouvrement est égal à $1,55 \times 10^{-08} \text{ mol.L}^{-1}$. Ces données expérimentales indiquent qu'un film trop épais avec un taux de recouvrement supérieur à $4 \times 10^{-10} \text{ mol.cm}^{-2}$, soit 5 équivalents de monocouches de complexe Ru(II) immobilisé sur l'électrode de platine diminue fortement la valeur du photocourant.

Donc un film épais ($1,6 \times 10^{-08} \text{ mol.cm}^{-2}$ soit 200 équivalents de monocouches) permet une mesure de photocourant de 113 nA alors qu'un film fin ($2,54 \times 10^{-10} \text{ mol.cm}^{-2}$ soit 3 équivalents de monocouches) permet l'obtention d'un photocourant beaucoup plus important de 440 nA. Ce comportement a déjà été démontré pour des polymères photosensibles qui peuvent être sujet à un phénomène de « self-quenching » entre les centres photosensibles.^[32] Le taux de recouvrement d'une valeur de $4 \times 10^{-10} \text{ mol.cm}^{-2}$, combine un fort pouvoir couvrant de l'électrode en évitant le « self-quenching » intermoléculaire.

Comme nous pouvons l'observer sur la Figure 81, un photocourant d'intensité maximale de 714 nA a été obtenu avec un taux de recouvrement de surface de $4 \times 10^{-10} \text{ mol.cm}^{-2}$, soit pour 5 équivalents de monocouches de complexe Ru(II) immobilisé sur l'électrode de platine. Ce taux de recouvrement de surface combine un fort pouvoir couvrant de

l'électrode en évitant le « self-quenching » intermoléculaire. Ainsi, pour la suite de ces travaux, le taux de recouvrement des films de poly-[Ru(bpy-pyrrole)₂(dpnn)]²⁺ élaborés sera compris entre $3 \text{ et } 4 \times 10^{-10} \text{ mol.cm}^{-2}$. Afin de contrôler au mieux la polymérisation, les films de Ru(II) seront formés par chronoampérométrie ($E = 0,75 \text{ V}$ et $Q = 2,5 \text{ mC.cm}^{-2}$).

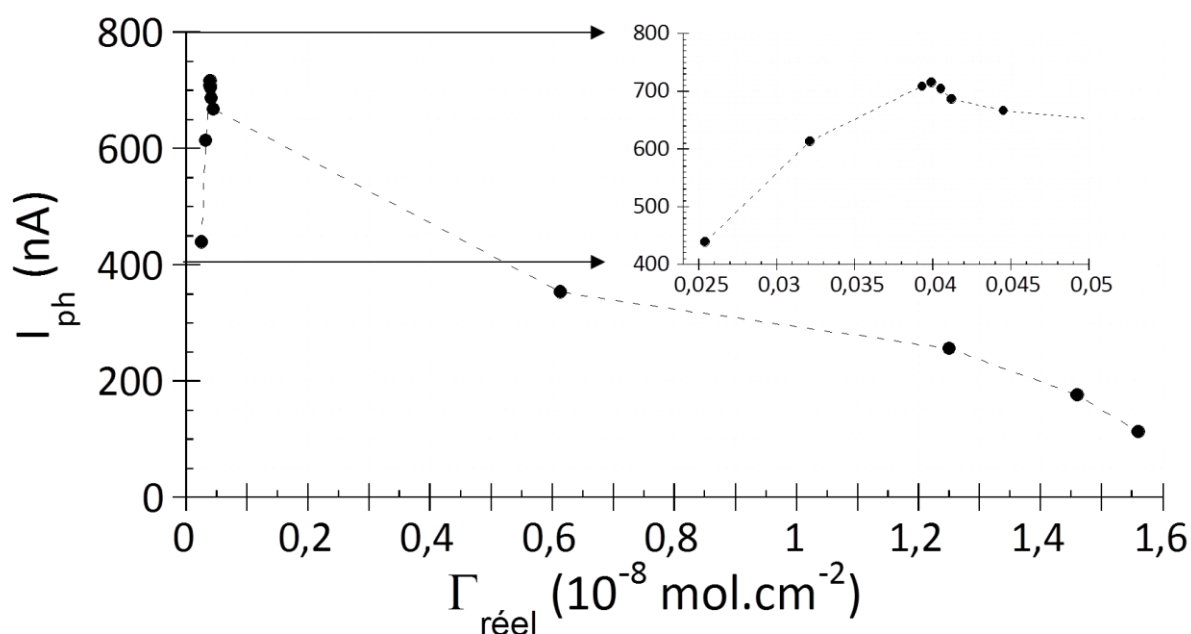


Figure 81. Photocourant généré par le film de poly-[Ru(bpy-pyrrole)₂(dpnn)]²⁺ (I_{ph}) en fonction du taux de recouvrement de l'électrode. Les mesures ont été réalisées dans une solution de PBS $0,01 \text{ mol. L}^{-1}$ pH 7,4 contenant de l'ascorbate de sodium 10 mmol.L^{-1} en polarisant l'électrode à 0 V vs. Ag/AgCl . Le filtre utilisé permet le passage uniquement de la lumière du domaine visible ($420 - 630 \text{ nm}$) (puissance surfacique de l'intensité lumineuse : $8,5 \mu\text{W.cm}^{-2}$).

IV. Élaboration d'un photobiocapteur pour la détection d'une séquence spécifique du VIH

Il existe des méthodes directes et indirectes de diagnostic du VIH (Virus de l'Immunodéficience Humaine). Le test ELISA qui est une méthode indirecte permet la détection d'anticorps anti-VIH et les techniques moléculaires telles que la PCR ou RT-PCR qui sont des méthodes directes permettent la détection d'ARN proviral ou d'ARN plasmatique.

Nous avons choisi de travailler avec l'ADN du VIH qui permet un diagnostic précoce du VIH. L'ADN du VIH est composé d'un brin appelé sonde et d'un brin cible complémentaire de l'ADN sonde. Les séquences de ces deux brins, déjà décrites dans la littérature.^[36,37] sont présentées dans le Tableau 12.

Tableau 12. Séquences de l'ADN sonde et de l'ADN cible utilisées pour l'élaboration de biocapteur à VIH

Séquence (5' → 3')	
ADN sonde	GAG ACC ATC AAT GAG GAA GCT G
ADN cible	ATC CCA TTC TGC AGC TTC CTC ATT GAT GGT CTC

Cette séquence d'ADN du VIH a déjà été utilisée au sein du laboratoire pour élaborer un biocapteur à détection directe par impédancemétrie^[38]. Ce biocapteur utilisait la spectroscopie d'impédance électrochimique pour détecter l'ADN cible du VIH. Pour cela, un film de poly-(pyrrole-NTA) avait tout d'abord été électrogénéré sur une électrode. Après incubation avec des ions Cu^{2+} , l'ADN sonde portant une étiquette tag histidine a été immobilisé sur le film de poly-(pyrrole-NTA). Ce dispositif analytique a permis la détection d'ADN cible avec une limite de détection très compétitive de $10^{-15} \text{ mol.L}^{-1}$.

Dans la littérature, on trouve un autre exemple de biocapteur électrochimique utilisant cette séquence d'ADN.^[37] Ce biocapteur est élaboré à partir d'un pyrrole couplé à l'ADN sonde. Celui-ci est électropolymérisé sur une électrode de graphite pour former un polymère capable de reconnaître l'ADN cible. La détection s'effectue par voltampérométrie cyclique en présence de ferrocène. Une limite de détection de $10^{-10} \text{ mol.L}^{-1}$ est atteinte.

La partie suivante est consacrée à l'élaboration d'un biocapteur photoélectrochimique pour la détection de l'ADN du VIH. Ainsi, après électropolymérisation du complexe de $[\text{Ru}(\text{bpy-pyrrole})_2(\text{dppn})]^{2+}$ sur une électrode de platine, l'électrode modifiée par le polymère, notée par la suite $\text{poly}[\text{Ru}(\text{bpy-pyrrole})_2(\text{dppn})]^{2+}$ sera incubée avec le duplex d'ADN du VIH à des concentrations différentes dans le but d'obtenir une courbe d'étalonnage.

1. Preuve de concept

a. Par photoélectrochimie

En utilisant les propriétés photoélectrochimiques et intercalantes des électrodes fonctionnalisées avec le $\text{poly-}[\text{Ru}(\text{bpy-pyrrole})_2(\text{dpnn})]^{2+}$, la détection du duplex d'ADN du VIH est étudiée. Le principe de ce biocapteur photoélectrochimique à ADN est basé sur le changement drastique des propriétés photoélectrochimiques du métallopolymère après intercalation du duplex d'ADN (reconnaissance de l'ADN sonde avec l'ADN cible).

Après polymérisation du complexe de $[\text{Ru}(\text{bpy-pyrrole})_2(\text{dppn})]^{2+}$, la valeur du photocourant est mesurée pour le polymère en présence d'ascorbate de sodium 10 mmol.L^{-1} préparé dans une solution de PBS $0,01 \text{ mol.L}^{-1}$ pH 7,4. Ensuite l'électrode est rincée dans la solution tampon sous vive agitation pendant 5 min avant d'être incubée avec $40 \mu\text{L}$ d'une solution d'ADN du VIH de concentration $6,4 \times 10^{-10} \text{ mol.L}^{-1}$ pendant 30 min. Pour finir, l'électrode est rincée deux fois dans la solution de tampon de PBS $0,01 \text{ mol.L}^{-1}$ pH 7,4 sous vive-agitation, pendant 15 minutes. Le photocourant mesuré sur l'électrode de $\text{poly-}[\text{Ru}(\text{bpy-pyrrole})_2\text{dppn}]^{2+}$ avant et après incubation avec l'ADN est présenté Figure 82A. Une diminution de 49 % du photocourant est observée, démontrant ainsi que le duplex d'ADN s'est intercalé sur le film de polymère. Cette diminution peut s'expliquer par l'encombrement stérique limitant la diffusion de l'ascorbate après l'immobilisation de l'ADN par intercalation dans le polymère. De plus, il est possible que des répulsions électrostatiques entre l'ADN (chargé négativement) et l'ascorbate entrent aussi en jeu dans la diminution du photocourant.^[39]

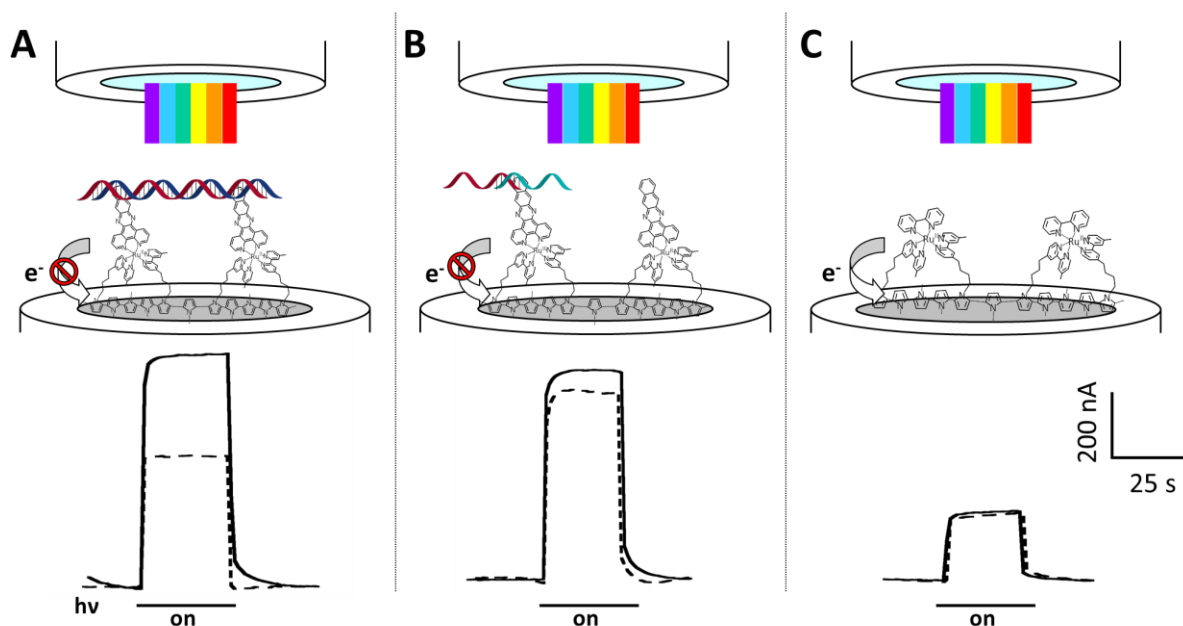


Figure 82. Photocourant (A). Pt/ poly-[Ru(bpy-pyrrole)₂(dppn)]²⁺ avant (----) et après (- - -) incubation dans une solution d'ADN double-brin du VIH de concentration $6,4 \times 10^{-10} \text{ mol.L}^{-1}$. (B). Photocourant d'une électrode Pt/ poly-[Ru(bpy-pyrrole)₂(dppn)]²⁺ avant (----) et après (- - -) incubation dans une solution d'ADN sonde et un ADN non complémentaire du VIH de concentration $6,4 \times 10^{-10} \text{ mol.L}^{-1}$. (C). Photocourant Pt / poly-[Ru(bpy)(bpy-pyrrole)₂]²⁺ sans ligand dppn avant (----) et après (- - -) incubation dans une solution d'ADN double-brin du VIH de concentration $6,4 \times 10^{-10} \text{ mol.L}^{-1}$.

Afin de vérifier que la diminution observée est bien due à l'intercalation du duplex d'ADN, plusieurs tests ont été réalisés. Le poly-[Ru(bpy-pyrrole)₂(dppn)]²⁺ a été incubé dans une solution d'ADN sonde de concentration $6,4 \times 10^{-10} \text{ mol.L}^{-1}$. Dans ce cas, la différence de photocourant mesurée avant et après incubation était de 2 % uniquement, indiquant qu'un monobrin d'ADN ne peut pas interagir avec le film de polymère.

La valeur de photocourant a également été mesurée après trois incubations successives dans une solution d'ascorbate 10 mmol.L^{-1} préparée dans du tampon PBS $0,01 \text{ mol.L}^{-1}$ pH 7,4 suivi de deux rinçages de 15 minutes dans une solution de PBS $0,01 \text{ mol.L}^{-1}$ sous agitation. Cette expérience est réalisée afin de vérifier que l'incubation successive de l'électrode dans le tampon de mesure n'induit pas de diminution du photocourant. À la fin de ces trois incubations, une différence de photocourant de seulement 3 % est observée, ce qui permet d'en déduire que le poly-[Ru(bpy-pyrrole)₂(dppn)]²⁺ n'est pas affecté par les incubations successives dans le tampon de mesure contenant l'ascorbate.

La spécificité de ce système a également été étudiée en incubant le brin d'ADN sonde avec un brin ADN cible non complémentaire (concentration de chaque brin $6,4 \times 10^{-10} \text{ mol.L}^{-1}$).

Dans ce cas, une diminution de 10% est observée (Figure 82B), démontrant la spécificité de notre système.

La génération du photocourant anodique a également été comparée à un complexe de $[\text{Ru}(\text{bpy})(\text{bpy-pyrrole})_2]^{2+}$ ne possédant pas de ligand dppn donc ne pouvant pas intercaler de duplex d'ADN^[22]. Pour cela, un film de poly- $[\text{Ru}(\text{bpy})(\text{bpy-pyrrole})_2]^{2+}$ a été électrogénéré afin d'obtenir un taux de recouvrement de surface compris entre 3×10^{-10} et $4 \times 10^{-10} \text{ mol.cm}^{-2}$. On note qu'après incubation avec une solution d'ADN double-brin du VIH, il n'y a pas de diminution du photocourant (Figure 82C). Considérant la faible constante de liaison à l'ADN du $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}$,^[22] cela confirme les meilleures propriétés intercalantes du poly- $[\text{Ru}(\text{bpy-pyrrole})_2(\text{dppn})]^{2+}$.

Après immobilisation du duplex d'ADN par intercalation, nous avons montré la réversibilité de celle-ci. Pour cela, l'électrode fonctionnalisée avec le poly- $[\text{Ru}(\text{bpy-pyrrole})_2\text{dppn}]^{2+}$ et le duplex d'ADN est plongée dans une solution de PBS 0,01 mol.L⁻¹ pH 7,4 à 86°C pendant 3 minutes puis est rincée pendant 15 min dans une solution de PBS à température ambiante. 82 % de la valeur du photocourant obtenu sans incubation d'ADN est retrouvée après l'augmentation de la température qui induit une dénaturation de l'ADN double-brin (séparation des 2 brins du duplex d'ADN). Cette expérience montre une réutilisation possible de ce biocapteur (Figure 83).

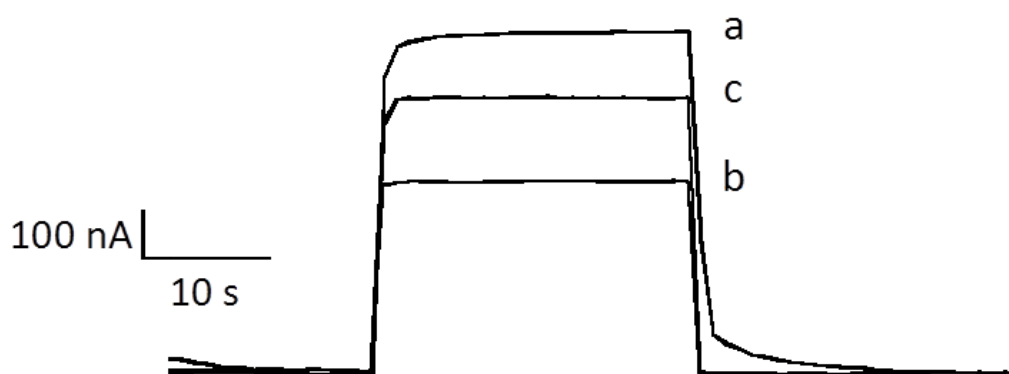


Figure 83. Photocourant mesuré (a). sur une électrode de platine fonctionnalisée avec du poly- $[\text{Ru}(\text{bpy-pyrrole})_2\text{dppn}]^{2+}$ (b). après incubation $3 \mu\text{mol.L}^{-1}$ de duplex d'ADN du VIH, (c). après chauffage de l'électrode. Les mesures de photocourant sont réalisées dans une solution d'ascorbate 10 mmol.L^{-1} / PBS pH 7,4, $E = 0 \text{ V}$ vs. Ag/AgCl.

b. Par microscopie à fluorescence

Nous avons également étudié l'immobilisation de l'ADN double-brin sur des microélectrodes d'or (Figure 84) en utilisant la microscopie de fluorescence.

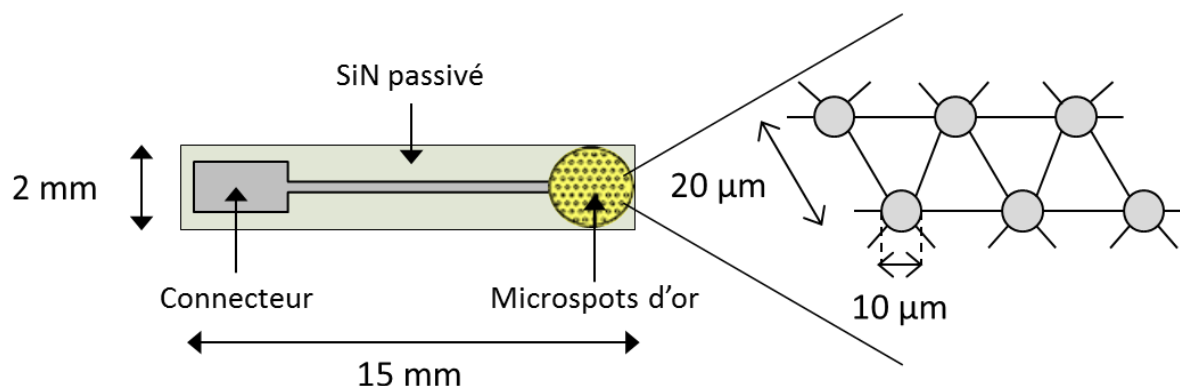


Figure 84. Représentation schématique des microélectrodes d'or utilisées en microscopie à fluorescence.

La surface de l'électrode utilisée est composée d'un réseau de microélectrodes de 10 µm de diamètre espacées de 20 µm. La surface de ces microélectrodes est élaborée sur des wafers de silicium recouverts d'une couche de silicium ($\approx 0,8 - 1 \mu\text{m}$) puis d'une fine couche de titane ($\approx 50 \text{ nm}$) permettant l'accrochage d'une couche d'or ($\approx 100 - 150 \text{ nm}$). Toute la surface du wafer est enfin passivée avec du nitrure de silicium (SiN) excepté le réseau de microélectrodes et le connecteur.

Le principe utilisé pour étudier l'interaction entre le polymère et l'ADN est représenté Figure 85 A. Dans un premier temps, les microélectrodes sont fonctionnalisées avec le poly- $[\text{Ru}(\text{bpy-pyrrole})_2(\text{dpnn})]^{2+}$ (20 cycles entre 0 et 0,75 V vs. Ag/Ag^+). Puis un ADN cible marqué avec une biotine à son extrémité 5' est hybridé avec un ADN sonde non marqué. Le mélange (20 µL) est ensuite déposé sur les microélectrodes d'or sur lesquelles un film de poly- $[\text{Ru}(\text{bpy-pyrrole})_2(\text{dppn})]^{2+}$ a été électrogénéré. Après rinçage, l'électrode est incubée avec un marqueur de fluorescence, la streptavidine-R-phytoerythrine (R-PE - 5 µg/mL) pendant 30 minutes avant d'être rincée avec une solution de PBS 0,01 mol. L^{-1} pH 7,4. La R-phytoerythrine possède un maximum d'excitation à 565 nm et une émission de fluorescence maximale à 575 nm.^[40] La visualisation de la fluorescence s'effectue grâce à l'utilisation d'un microscope à épifluorescence avec un filtre Cy3.

Les Figure 85 B et C montrent les images de fluorescence obtenues avec les microélectrodes d'or fonctionnalisées. Un signal de fluorescence est observé uniquement si l'ADN double-brin est biotinylé (Figure 85C) alors qu'en absence d'ADN double brin, aucun signal n'est

observé (Figure 85B). Le fait que le phénomène de fluorescence soit localisé précisément à la surface de l'électrode indique que la streptavidine est immobilisée via des interactions affines avec le duplex d'ADN biotinylé. Ces expériences permettent de confirmer sans ambiguïté l'immobilisation de l'ADN double-brin du VIH par intercalation avec le poly- $[\text{Ru}(\text{bpy-pyrrole})_2\text{dppn}]^{2+}$ une fois le duplex formé.

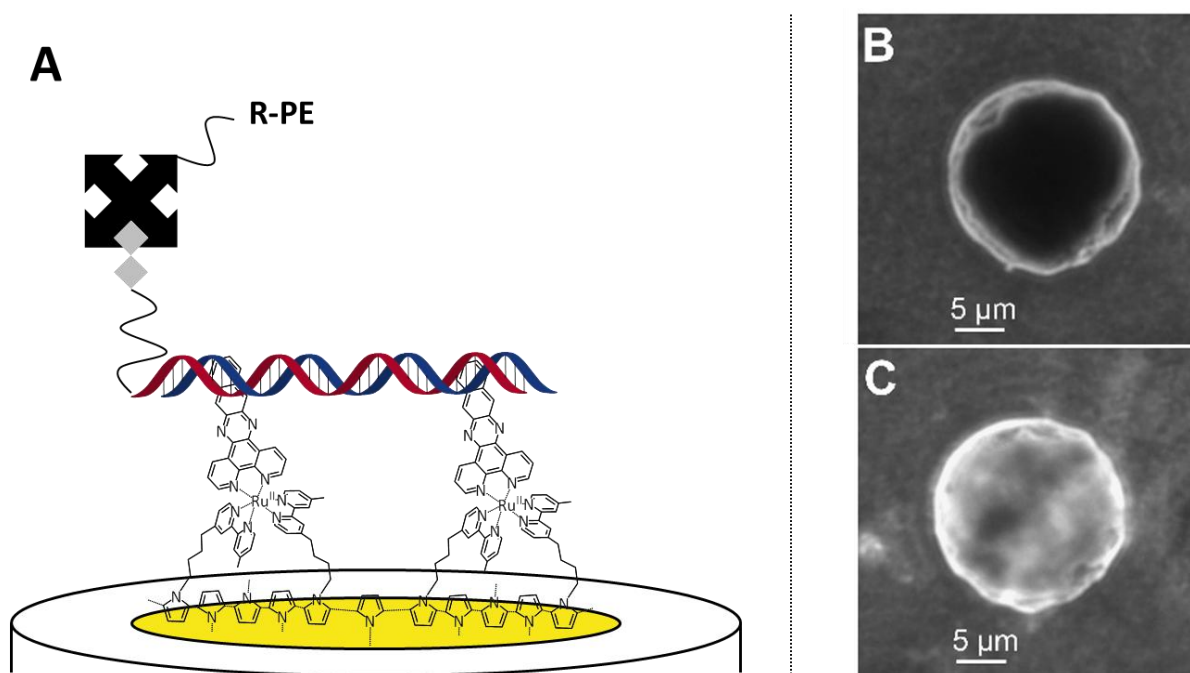


Figure 85. (A). Représentation schématique d'un double-brin d'ADN immobilisé et marqué avec la streptavidine-R-phycoerythrine (R-PE). Images de fluorescence des microélectrodes d'or fonctionnalisées avec le poly- $[\text{Ru}(\text{bpy-pyrrole})_2\text{dppn}]^{2+}$ puis incubées (B) dans une solution de R-PE de $5 \mu\text{g.mL}^{-1}$ (C). dans une solution d'ADN double-brin biotinylé ($1 \mu\text{mol.L}^{-1}$) puis dans la solution de R-PE $5 \mu\text{g.mL}^{-1}$.

2. Courbe d'étalonnage de la détection d'ADN du VIH

La relation concentration/signal a été étudiée par mesure photoélectrochimique dans le but d'établir une courbe d'étalonnage. Pour cela, deux méthodologies ont été utilisées. La première méthodologie consiste à maintenir la concentration d'ADN sonde constante et à faire varier la concentration en ADN cible. Dans la seconde technique, la concentration en ADN sonde est identique à celle de l'ADN cible (1 équivalent d'ADN sonde pour 1 équivalent d'ADN cible).

Il est à préciser que la solution d'ADN du VIH est préparée avant l'incubation afin de s'assurer que l'hybridation entre l'ADN sonde et cible soit optimale. Pour cela, l'hybridation est réalisée en chauffant les brins d'ADN sonde et d'ADN cible pendant une minute à 90°C .

La redescende lente de la température jusqu'à température ambiante permet d'obtenir une hybridation optimale des deux brins d'ADN. La Figure 86 décrit en partie ce protocole.

Pour réaliser ces courbes d'étalonnage, une mesure de photocourant du film de poly- $[\text{Ru}(\text{bpy-pyrrole})_2(\text{dppn})]^{2+}$ est d'abord réalisée dans une solution d'ascorbate 10 mmol.L^{-1} préparée dans une solution tampon PBS pH 7,4 saturée en argon en polarisant l'électrode à 0V vs Ag/AgCl . Puis l'électrode est rincée dans la solution tampon sous agitation avant d'être incubée avec $40 \mu\text{L}$ d'une solution d'ADN du VIH. Ensuite, l'électrode est rincée deux fois pendant 15 minutes sous vive agitation avant de mesurer la valeur du photocourant.

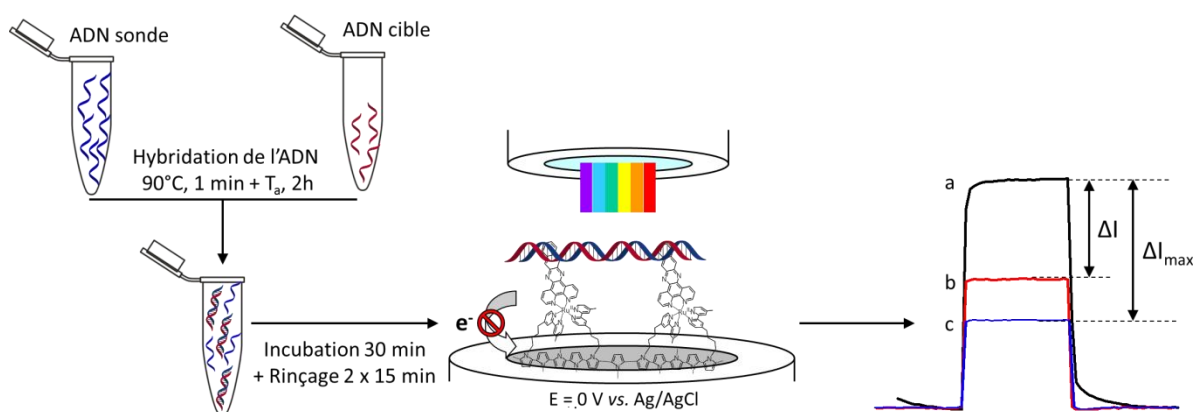


Figure 86. Principe de l'élaboration du biocapteur photoélectrochimique pour la détection de l'ADN du VIH. T_a : température ambiante, ΔI : différence de photocourant mesuré entre le poly- $[\text{Ru}(\text{bpy-pyrrole})_2(\text{dppn})]^{2+}$ et poly- $[\text{Ru}(\text{bpy-pyrrole})_2(\text{dppn})]^{2+}$ modifié avec l'ADN du VIH. ΔI_{max} : différence de photocourant entre le poly- $[\text{Ru}(\text{bpy-pyrrole})_2(\text{dppn})]^{2+}$ et poly- $[\text{Ru}(\text{bpy-pyrrole})_2(\text{dppn})]^{2+}$ modifié avec une concentration saturante d'ADN. Les mesures de photocourant sont réalisées dans une solution d'ascorbate 10 mmol.L^{-1} / PBS.

Pour la réalisation des courbes d'étalonnage, on s'intéresse à la diminution de la valeur du photocourant induite par l'intercalation du duplex d'ADN par rapport au photocourant du film de poly- $[\text{Ru}(\text{bpy-pyrrole})_2(\text{dppn})]^{2+}$. La mesure de photocourant correspondant au film de poly- $[\text{Ru}(\text{bpy-pyrrole})_2(\text{dppn})]^{2+}$ est notée I_0 (Figure 86a). La différence de photocourant induit par l'intercalation du duplex d'ADN sur le ligand dppn est notée ΔI , comme indiqué sur la Figure 86b. On notera ΔI_{max} (Figure 86c), la différence de photocourant entre I_0 et la valeur de photocourant obtenue pour une concentration d'ADN saturant la surface du polymère.

a. Première stratégie

Pour réaliser cette première courbe d'étalonnage, nous avons fixé la concentration d'ADN sonde à $6,4 \times 10^{-10} \text{ mol.L}^{-1}$ et fait varier la concentration d'ADN cible entre chaque mesure pour atteindre une concentration maximale égale à la concentration en ADN sonde, soit $6,4 \times 10^{-10} \text{ mol.L}^{-1}$. Les résultats obtenus sont présentés Figure 87.

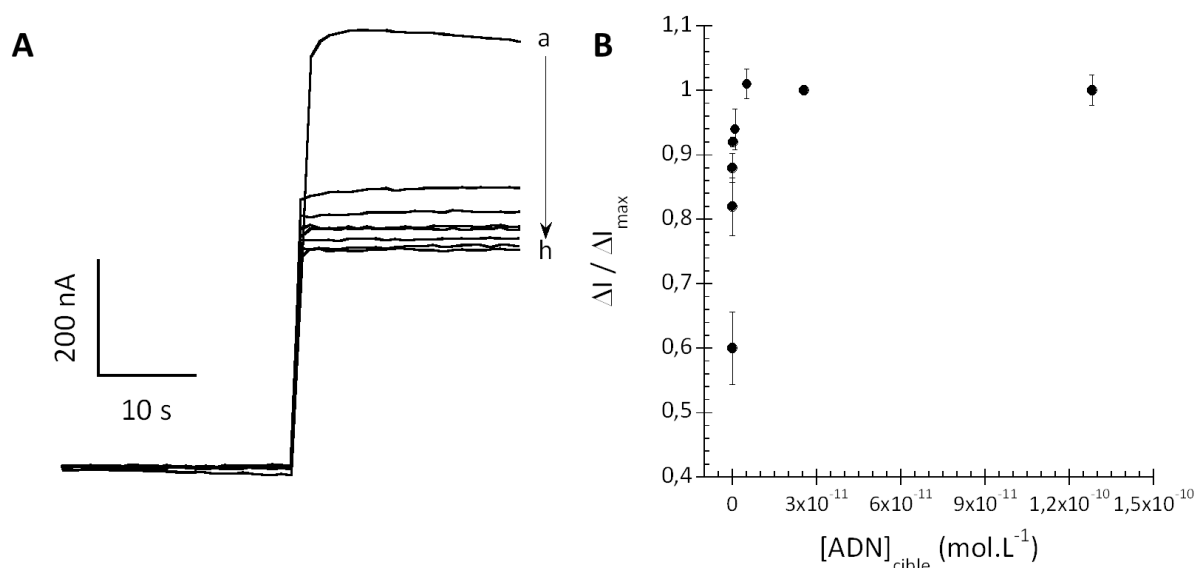


Figure 87. (A). Photocourant mesuré sur une électrode de platine fonctionnalisée avec (a) poly-[Ru(bpy-pyrrole)₂dppn]²⁺ puis après incubation avec différentes concentrations de duplex d'ADN du VIH où [ADN]_{sonde} = $6,4 \times 10^{-10} \text{ mol.L}^{-1}$ et [ADN]_{cible} égale à (b). $1,7 \times 10^{-15} \text{ mol.L}^{-1}$, (c). $8,2 \times 10^{-15} \text{ mol.L}^{-1}$, (d). $4,1 \times 10^{-14} \text{ mol.L}^{-1}$, (e). $2,1 \times 10^{-13} \text{ mol.L}^{-1}$, (f). $1,0 \times 10^{-12} \text{ mol.L}^{-1}$, (g). $5,1 \times 10^{-12} \text{ mol.L}^{-1}$, (h). $6,4 \times 10^{-10} \text{ mol.L}^{-1}$. Mesures de photocourant réalisées dans une solution d'ascorbate 10 mmol.L^{-1} / PBS pH 7,4, E = 0 V vs. Ag/AgCl (B). Courbe d'étalonnage de l'ADN cible du VIH. Les barres d'erreurs ont été calculées sur 8 électrodes.

La Figure 87A présente les chronoampérogrammes obtenues pour les différentes concentrations d'ADN testées. On note une forte diminution du photocourant ($\Delta I = 165 \text{ nA}$) après l'incubation de la première concentration d'ADN du VIH testée ($1,7 \times 10^{-15} \text{ mol.L}^{-1}$). Puis la diminution induite suite aux différentes incubations successives avec différentes concentrations d'ADN testées est moins importante. À partir de ces chronoampérogrammes, la courbe d'étalonnage, qui est représentée par $\Delta I / \Delta I_{\text{max}}$, en fonction de la concentration en ADN cible, est tracée (Figure 87B). Elle est caractérisée par une partie linéaire pour des concentrations d'ADN cible comprises entre $8,2 \times 10^{-15}$ et $5,1 \times 10^{-12} \text{ mol.L}^{-1}$ puis par un plateau au-delà de cette concentration.

b. Seconde stratégie

La seconde technique testée pour l'élaboration d'un biocapteur photoélectrochimique pour la détection de l'ADN du VIH consiste à immobiliser le duplex, formé à partir de l'ADN cible et l'ADN sonde en même proportion. Pour cela, différentes concentrations de duplex d'ADN variant de $9,7 \times 10^{-16} \text{ mol.L}^{-1}$ à $7,6 \times 10^{-11} \text{ mol.L}^{-1}$ ont été utilisées. Le même protocole expérimental (temps d'incubation, rinçage, potentiel de polarisation de l'électrode) que celui de la première stratégie a été suivi. L'intercalation de l'ADN double-brin a été mesurée par mesures photoélectrochimiques. Les mesures de photocourant n'étaient pas très reproductibles. Ce qui peut s'expliquer par des liaisons non spécifiques à la surface de l'électrode. Pour résoudre ce problème, un rinçage de l'électrode avec du SDS (Sodium Dodécyl Sulfate) 0,1% ^[41] préparé dans une solution de PBS ainsi qu'un second rinçage dans du tampon PBS sous vive agitation sont réalisés après l'incubation avec l'ADN effectuée.

La Figure 88A présente les chronoampérogrammes obtenus dans ces conditions de mesure pour les différentes concentrations d'ADN testées.

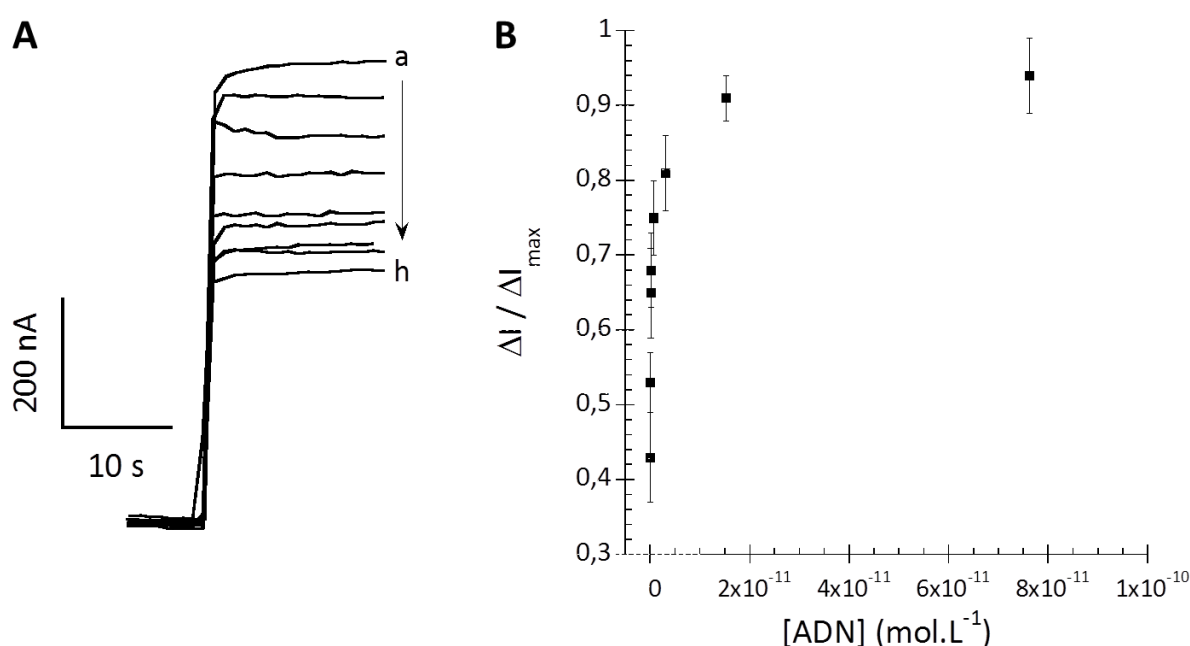


Figure 88. (A). Photocourant mesuré sur une électrode de platine fonctionnalisée avec (a) poly-[Ru(bpy-pyrrole)₂dppn]²⁺ puis avec différentes concentrations de duplex d'ADN du VIH où $[ADN]_{\text{sonde}} = [ADN]_{\text{cible}}$ (b). $9,7 \times 10^{-16} \text{ mol.L}^{-1}$, (c). $4,9 \times 10^{-15} \text{ mol.L}^{-1}$, (d). $2,4 \times 10^{-14} \text{ mol.L}^{-1}$, (e). $1,2 \times 10^{-13} \text{ mol.L}^{-1}$, (f). $6,1 \times 10^{-13} \text{ mol.L}^{-1}$, (g). $3,1 \times 10^{-12} \text{ mol.L}^{-1}$, (h). $1,5 \times 10^{-11} \text{ mol.L}^{-1}$, (i). $7,6 \times 10^{-11} \text{ mol.L}^{-1}$. Les mesures de photocourant sont réalisées dans une solution d'ascorbate 10 mmol.L^{-1} / PBS pH 7,4, $E = 0 \text{ V vs. Ag/AgCl}$. (B). Courbe d'étalonnage de l'ADN cible du VIH. Les barres d'erreurs ont été calculées sur 8 électrodes.

On note une diminution progressive du photocourant suite aux incubations successives des différentes concentrations d'ADN du VIH testée (Figure 88A). À partir de ces chronoampérogrammes, la courbe d'étalonnage de l'ADN, qui est représentée par la variation de $\Delta I / \Delta I_{\max}$ en fonction de la concentration en ADN, est tracée (Figure 88B). Une droite est obtenue pour des concentrations comprises entre $4,9 \times 10^{-15}$ et $7,6 \times 10^{-11} \text{ mol.L}^{-1}$.

3. Comparaison des deux courbes d'étalonnage obtenues

Dans le but de décrire les interactions entre le poly-[Ru(bpy-pyrrole)₂dppn]²⁺ et l'ADN, les données expérimentales sont analysées en utilisant les isothermes de Langmuir et Langmuir-Freundlich^[42].

a. Traitement des données expérimentales par l'isotherme de Langmuir

Dans un premier temps, les données expérimentales sont analysées par l'isotherme de Langmuir. En considérant que $\Delta I / \Delta I_{\max}$ est le taux de recouvrement du poly-[Ru(bpy-pyrrole)₂dppn]²⁺ par l'ADN, on peut écrire l'équation de Langmuir de la façon suivante :

$$\text{Équation 20} \quad \frac{\Delta I}{\Delta I_{\max}} = \frac{[ADN]}{K_d + [ADN]}$$

Où K_d est la constante de dissociation entre l'ADN double-brin et le polymère de ruthénium.

La Figure 89 présente le résultat de cette simulation.

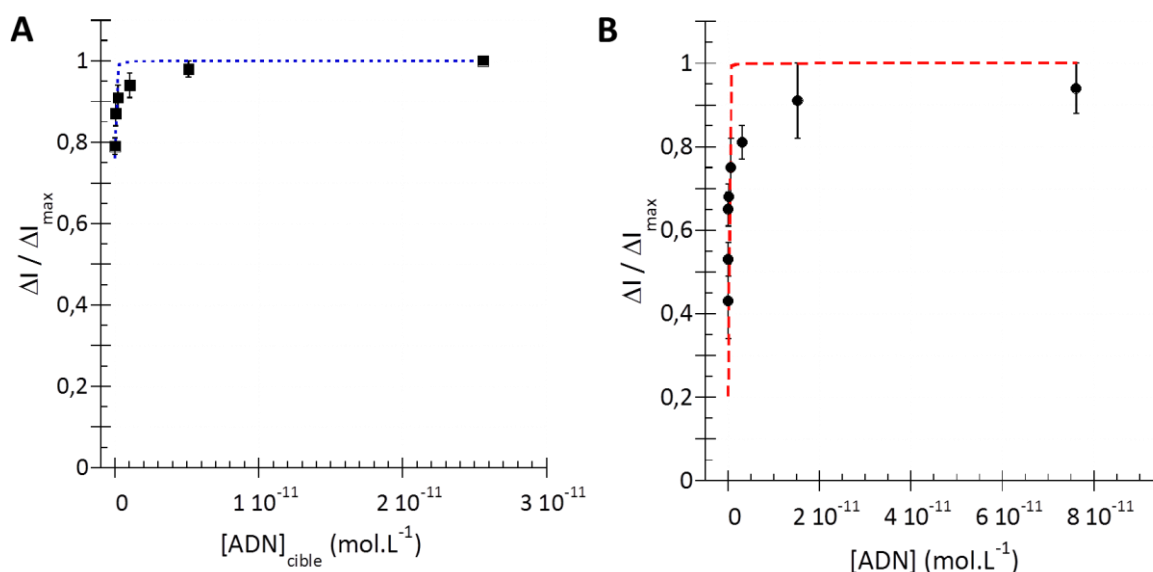


Figure 89. Variation de $\Delta I / \Delta I_{\max}$ en fonction du logarithme de la concentration d'ADN du VIH représentant les courbes issues de la simulation avec l'équation de Langmuir. Les électrodes ont été incubées successivement avec des concentrations croissantes (A). d'ADN cible (■, - - -) et $[ADN_{\text{sonde}}] = 6,40 \times 10^{-10} \text{ mol.L}^{-1}$ et (B). $[ADN_{\text{sonde}}] = [ADN_{\text{cible}}]$ (●, - - -). Les données expérimentales sont représentées par ● et ■ et les courbes de simulation associées par - - - et - - -. Les barres d'erreurs représentent la déviation standard sur au moins 8 électrodes.

La Figure 89A montre les données expérimentales obtenues avec des concentrations croissantes d'ADN cible du VIH et une concentration constante d'ADN sonde ($6,40 \times 10^{-10} \text{ mol.L}^{-1}$) ainsi que les courbes issues de la simulation avec l'équation de Langmuir. Un R^2 de 0,476 est obtenu. La Figure 89B montre les données expérimentales avec la courbe de simulation obtenues avec des concentrations croissantes d'ADN double-brin du VIH ($[ADN_{\text{sonde}}] = [ADN_{\text{cible}}]$) ($R^2 = 0,312$). Au vu des faibles valeurs de R^2 obtenues, l'isotherme de Langmuir n'est pas adaptée pour le traitement de nos données expérimentales et la valeur de K_d ne peut pas être déterminée. Nous avons donc décidé de traiter les valeurs expérimentales avec l'isotherme de Langmuir- Freundlich.

b. Traitement des données expérimentales par l'isotherme de Langmuir-Freundlich

Pour utiliser ce modèle, nous avons considéré de la même manière que le rapport $\Delta I / \Delta I_{\max}$ peut être assimilé au taux de recouvrement du poly- $[\text{Ru}(\text{bpy-pyrrole})_2\text{dppn}]^{2+}$ par l'ADN. On peut donc écrire l'équation de Freundlich de la façon suivante :

$$\text{Équation 21} \quad \frac{\Delta I}{\Delta I_{\max}} = \frac{[ADN]^n}{K_d + [ADN]^n}$$

Où K_d est la constante de dissociation entre l'ADN double-brin et le poly- $[\text{Ru}(\text{bpy-pyrrole})_2\text{dppn}]^{2+}$ et n le coefficient de Freundlich qui permet de tenir compte de l'hétérogénéité de la surface. Les résultats issus de cette simulation sont présentés Figure 90.

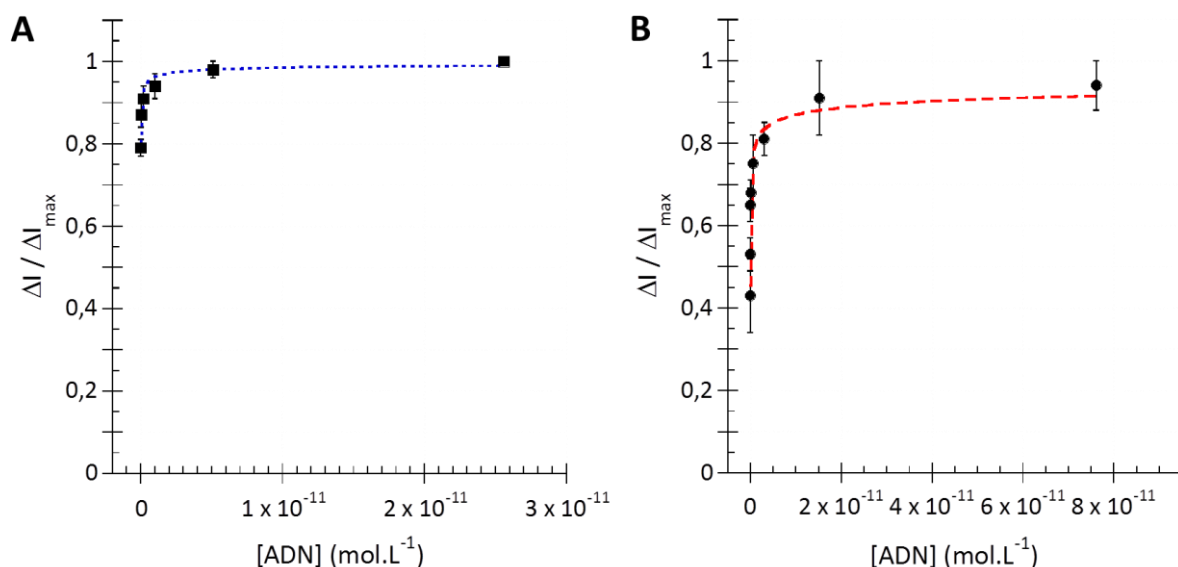


Figure 90. Variation de $\Delta I / \Delta I_{\max}$ en fonction du logarithme de la concentration d'ADN du VIH et les courbes issues de la simulation avec l'équation de Langmuir-Freundlich. Les électrodes ont été incubées successivement avec des concentrations croissantes (A). d'ADN cible (■, - - -) et $[ADN_{\text{sonde}}] = 6,40 \times 10^{-10}$ mol.L⁻¹ et (B). $[ADN_{\text{sonde}}] = [ADN_{\text{cible}}]$ (●, - - -). Les données expérimentales sont représentées par ● et ■ et les courbes de simulation associées par - - - et - - -. Les barres d'erreurs représentent la déviation standard sur au moins 8 électrodes

La Figure 90A montre les données expérimentales obtenues avec des concentrations croissantes d'ADN cible du VIH et une concentration fixe d'ADN sonde ($6,40 \times 10^{-10}$ mol.L⁻¹). On remarque que la courbe résultant de la simulation par l'équation de Langmuir-Freundlich passe par tous les points expérimentaux. Un R^2 de 0,964 est obtenu. De plus, on note la formation d'un plateau correspondant à la saturation de la surface du polymère par l'ADN. Ainsi, il est possible de déterminer la valeur de la constante de dissociation K_d égale à $5,4 \times 10^{-7}$ mol.L⁻¹ et la constante d'association K_a égale à $1,9 \times 10^6$ L.mol⁻¹.

La Figure 90B montre les données expérimentales obtenues avec des concentrations croissantes d'ADN double-brin du VIH ($[ADN_{\text{sonde}}] = [ADN_{\text{cible}}]$) ainsi que la courbe résultant de la simulation par l'équation de Langmuir – Freundlich. On note que cette courbe passe par tous les points expérimentaux et forme un plateau pour tendre vers 1 indiquant que lorsque la concentration est supérieure à $3,1 \times 10^{-12}$ mol.L⁻¹, la surface du polymère commence à être complètement recouverte par les duplex d'ADN. Il est donc possible de déterminer la valeur de la constante de dissociation K_d égale à $4,1 \times 10^{-4}$ mol.L⁻¹ et la constante d'association K_a égale à $2,5 \times 10^3$ L.mol⁻¹. Cette valeur est plus faible que celle trouvée précédemment. Cela peut s'expliquer par la présence de SDS dans le tampon qui peut interagir partiellement avec le duplex d'ADN intercalé.

Le Tableau 13 récapitule les constantes calculées avec les isothermes de Langmuir et Langmuir-Freundlich pour les deux courbes d'étalonnage réalisées précédemment.

Tableau 13. Récapitulatif des constantes déterminées par les isothermes de Langmuir et Langmuir – Freundlich pour la détection de l'ADN du VIH par photoélectrochimie après intercalation sur un film de poly-[Ru(bpy-pyrrole)₂(dppn)]²⁺.

Modèle	Conditions de rinçage	Stratégie	K_d (mol.L ⁻¹)	K_a (L.mol ⁻¹)	n	R ²
Langmuir	sans SDS	1	/	/	/	0,476
	avec SDS	2	/	/	/	0,312
Langmuir-Freundlich	sans SDS	1	$5,4 \times 10^{-7}$	$1,9 \times 10^6$	0,41	0,964
	avec SDS	2	$4,1 \times 10^{-4}$	$2,5 \times 10^3$	0,24	0,980

L'isotherme de Langmuir-Freundlich est le modèle qui permet d'analyser les données expérimentales obtenues. Ce modèle permet de prendre en compte l'hétérogénéité de la surface de l'électrode. Une valeur de n relativement éloigné de 1 montre une certaine hétérogénéité dans l'interaction de l'ADN avec la surface. Ceci peut s'expliquer par la complexité de l'intercalation des duplex d'ADN avec le métallopolyimère qui peut faire intervenir une ou plusieurs unités (dppn) par duplex d'ADN. La valeur de K_a obtenue sans SDS est en parfaite adéquation avec la constante d'association de l'ADN avec des complexes de ruthénium possédant un ligand dppn. En effet, pour un complexe en solution, la valeur de K_a trouvée dans la littérature se trouve autour de 10^6 L.mol⁻¹.^[22]

Une échelle logarithmique permet de linéariser les points expérimentaux sur toute la gamme de mesures (Figure 91).

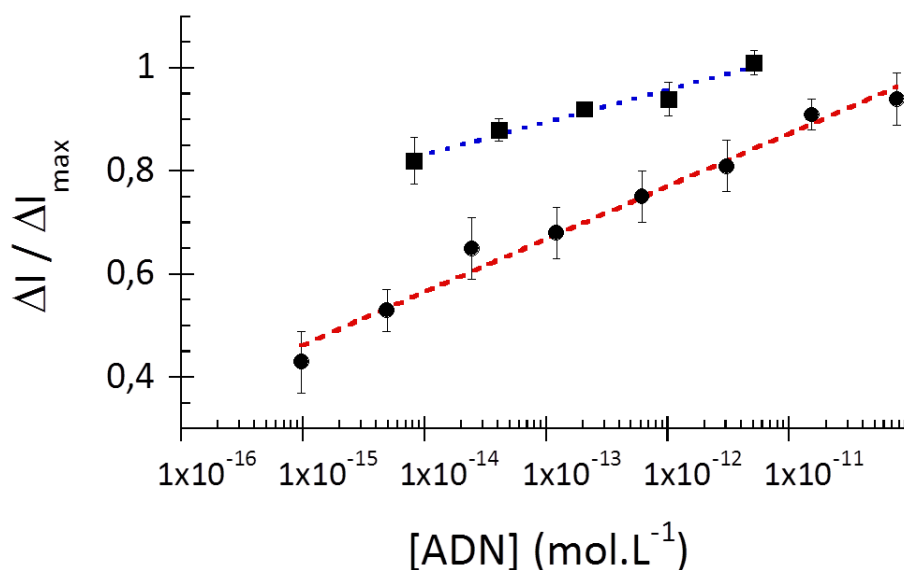


Figure 91. Gammes linéaires des deux systèmes étudiés. La première stratégie où la $[ADN_{sonde}] = 6,40 \times 10^{-10} \text{ mol.L}^{-1}$ et la $[ADN_{cible}]$ varie est représentée par (■, - - -) et la seconde stratégie où $[ADN_{sonde}] = [ADN_{cible}]$ est représentée par (●, - - -).

Dans le cas des données expérimentales obtenues avec des concentrations croissantes d'ADN cible du VIH et une concentration fixe d'ADN sonde, la courbe d'étalonnage obtenue présente une limite de détection de 8 fmol.L^{-1} et une sensibilité de 0,06 unités de $\Delta I/\Delta I_{\max}$ par décade ($R^2 = 0,976$) avec une gamme de linéarité allant de 8×10^{-15} à $5 \times 10^{-12} \text{ mol.L}^{-1}$. La même limite de détection a été mesurée avec différentes électrodes. Dans le cas des données expérimentales obtenues avec des concentrations croissantes d'ADN double-brin du VIH, la courbe d'étalonnage présente une faible limite de détection $10^{-15} \text{ mol.L}^{-1}$ avec une reproductibilité de 97 % et une sensibilité de 0,01 unité de $\Delta I/\Delta I_{\max}$ par décade ($R^2 = 0,981$) et avec une gamme de linéarité allant de 10^{-15} à $3,1 \times 10^{-10} \text{ mol.L}^{-1}$.

Dans le domaine des techniques de détection électrochimique, cette approche photoélectrochimique montre une excellente sensibilité. La limite de détection de l'ordre du femtomolaire est comparable à celles obtenues pour des systèmes de détection utilisant, l'intercalation de systèmes redox, (500 fmol.L^{-1}),^[43] le marquage d'enzyme (10 fmol.L^{-1}),^[44] la spectroscopie d'impédance électrochimique (1 fmol.L^{-1}),^[38,45] l'utilisation de nanoparticules^[46-48] ou utilisant des systèmes en épingles à cheveux (hairpine).^[49] Donc le biocapteur élaboré à base de $\text{poly-[Ru(bpy-pyrrole)}_2\text{dppn}]^{2+}$ est compétitif puisque ce système permet d'obtenir une limite de détection de l'ordre de $10^{-15} \text{ mol.L}^{-1}$.

4. Conclusion

Pour conclure cette partie, un nouveau complexe de ruthénium a été synthétisé. Ce complexe combine plusieurs propriétés. Il est électropolymérisable (présence des groupements pyrroles), photosensible (centre polypyridinique de Ru^{II}) et possède une forte affinité pour les duplex d'ADN (ligand dppn).

Grâce aux propriétés intercalantes du métallopolypyrrole électrogénéré, un dispositif capable d'immobiliser sélectivement un ADN double-brin du VIH a été élaboré. Cette approche photoélectrochimique est innovante et ne nécessite aucun marquage préalable de l'ADN.

Ce biocapteur représente une alternative intéressante et peu coûteuse comparé aux biocapteurs nécessitant un marquage de l'ADN. Bien sûr, plusieurs inconvénients restent à encore être étudiés. Ce biocapteur a en particulier un système de type « signal off », c'est-à-dire que la reconnaissance est basée sur une décroissance du signal. Ce type de système peut engendrer des interférences importantes dans des milieux plus complexes et de faibles rapports signal/bruit. D'autre part, ce système perd sa spécificité si plusieurs types de duplex d'ADN sont présents dans le milieu. Par conséquent, dans la seconde partie de ce chapitre, nous avons conçu un biocapteur à ADN photoélectrochimique spécifique à la cible détectée. C'est pour cette raison que nous nous sommes tournés vers l'utilisation d'aptamères pour la détection et le dosage de la cocaïne.

V. Élaboration d'un photobiocapteur pour la détection de la cocaïne par immobilisation d'un aptamère

1. Aptacapteurs électrochimiques de la cocaïne

La cocaïne (Figure 92) est une molécule extraite des feuilles de coca qui, après extraction et purification, se retrouve sous forme de poudre blanche.

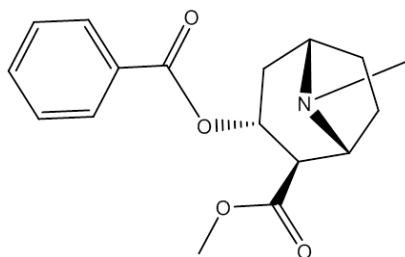


Figure 92. Structure chimique de la cocaïne

Longtemps considéré comme un médicament « miracle », la cocaïne est aujourd'hui classée dans la catégorie des stupéfiants et est la deuxième drogue la plus consommée au monde après le cannabis, d'après l'Observatoire Français des Drogues et des Toxicomanies (OFDT).^[50] Toujours selon ce même organisme, la prise de cocaïne serait à l'origine de complications somatiques (complications cardio-vasculaires, neurologiques, pulmonaires...) et psychiques (dépression, anxiété, tentative de suicide...) connues seulement par un faible nombre de consommateurs.

Véritable problème de santé publique touchant toutes les tranches d'âge et toutes les catégories sociales en France, la conception de diagnostics cliniques simples, rapides, peu coûteux et pouvant être utilisés partout est un enjeu important dans le développement de ce type de capteur. Pour cela, l'élaboration de capteurs électrochimiques et photoélectrochimiques pour la détection et la quantification de cocaïne peut s'avérer être une solution pertinente.

Comme décrit dans le chapitre I, depuis quelques années les aptamères ont été introduits comme récepteurs pour réaliser des outils de diagnostic performants. Les aptamères sont des courts oligonucléotides artificiels capables de reconnaître et de fixer de manière spécifique, avec une affinité comparable à celle d'un anticorps^[9], diverses molécules telles

que des protéines^[8,51], des toxines^[52] et la cocaïne.^[53] Une fois la reconnaissance de la cible effectuée, l'aptamère va changer de conformation.

Différents aptacapteurs électrochimiques ont été proposés, en particulier basés sur une détection par impédancemétrie^[10,54], DPV^[55], ECL^[56] et photoélectrochimie^[10]. Cette dernière technique a été en particulier développée par l'équipe d'Itamar Willner (Figure 93).

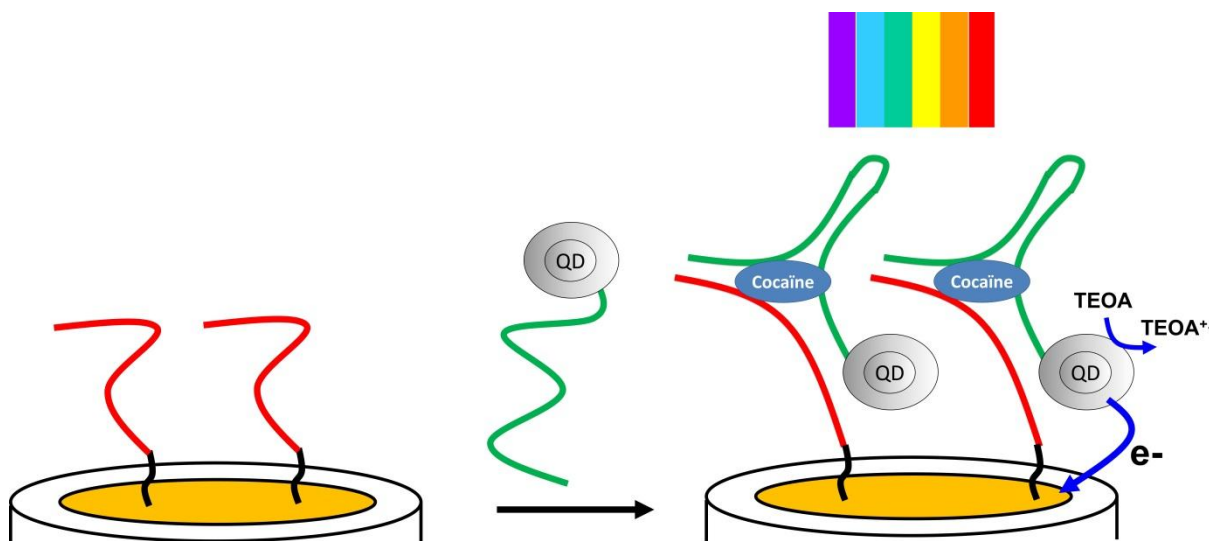


Figure 93. Aptacapteur photoélectrochimique de la cocaïne basé sur la modification d'une surface d'électrode d'or et de quantum dots (QD) par des fragments de l'aptamère anti-cocaïne^[10]

Dans cet exemple, un fragment de l'aptamère à cocaïne est d'abord immobilisé sur une électrode d'or tandis que le second fragment est immobilisé sur une nanoparticule semi-conductrice de sulfure de cadmium (CdS). En présence de différentes concentrations de cocaïne, un photocourant mesuré à l'électrode est généré par la formation du complexe aptamère-cocaïne à partir des deux fragments.

L'élaboration d'un aptacapteur pour la détection de la cocaïne est particulièrement adapté au concept de biocapteur photoélectrochimique décrit précédemment. En effet, une fois la cocaïne reconnue par l'aptamère, celui-ci forme des boucles possédant des régions d'oligonucléotides hybridés, et potentiellement capables d'interagir avec des métallointercallants tel que le métallopolymer de $[\text{Ru}(\text{bpy-pyrrole})_2(\text{dppn})]^{2+}$.

2. Description et synthèse des aptamères

Pour la détection de la cocaïne, il existe trois types d'aptamères^[57] : le mono-fragment (MF) (Figure 94A), le double-fragment (DF) (Figure 94B) qui est un aptamère mono-fragment coupé en deux et le triple-fragment (TF) (Figure 94C) qui est un aptamère mono-fragment divisé en trois.

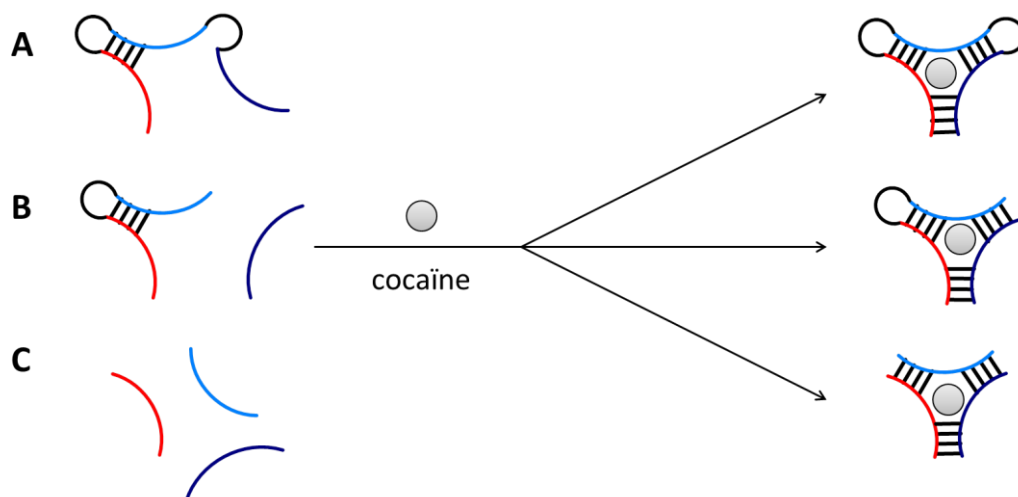


Figure 94. Structure de la conformation des différents types d'aptamère capable de reconnaître la cocaïne. : Aptamère (A). mono-fragment (MF), (B). double-fragment (DF) et (C). triple-fragment (TF). (adapté de Zou et al.^[57])

En absence de cocaïne, l'aptamère mono-fragment est en partie replié. Les différentes parties composant l'aptamère double et triple-fragments sont quant à eux séparés et isolés. En présence de cocaïne, les différents fragments composant ces aptamères vont se rassembler autour de la cocaïne. Donc, le repliement de l'aptamère anti-cocaïne est induit par la présence de la cocaïne. Le mono-fragment possède une affinité pour la cocaïne ($K_d = 18 \mu\text{mol.L}^{-1}$ à 25 °C) plus importante que le DF ($K_d = 120 \mu\text{mol.L}^{-1}$ à 25 °C) qui lui possède une affinité plus importante que le TF ($K_d = 111 \mu\text{mol.L}^{-1}$ à 5 °C)^[51]. Compte tenu que l'utilisation du TF impose de travailler à basse température, nous avons décidé d'utiliser le MF et le DF.

a. Synthèse

Dans le cadre de ce travail, deux aptamères anti-cocaïne ont été synthétisés : le mono-fragment et le double-fragment. La séquence de l'aptamère anti-cocaïne mono-fragment a été décrite par Zhao et al.,^[58] et celle de l'aptamère double-fragment par Zou et al.^[57] Ces séquences sont présentées dans le Tableau 14.

Tableau 14. Séquences d'oligonucléotides utilisées dans le cadre de ce travail pour la détection de cocaïne

Nom de l'aptamère		Séquence (5' → 3')
mono-fragment		GGG AGA CAA GGA AAA TCC TTC AAT GAA GTG GGT CGA CA
double-fragments	aptamère α	GTT CTT CAA TGA AGT GTG GGA CGA CA
	aptamère β	GGG AGT CAA GAA C

La synthèse de ces aptamères a été réalisée sur une échelle de 1 μmol sur support solide de silice (LCAA-CPG : Long chain alkyl amin controled pore glass, 500 Å) commercial et s'effectue de l'extrémité 3' vers l'extrémité 5'. Le nucléotide qui est situé à l'extrémité 3' est relié au support solide par un lien succinyle). Le support est placé à l'intérieur de colonnes spéciales, séchées sous argon puis installées dans le synthétiseur. Les différents oligonucléotides sont assemblés sur ce support par synthèse automatisée et s'effectue selon le cycle de synthèse présenté Figure 95. Cette méthode de synthèse est appelée méthode de synthèse aux « phosphoramidites ».

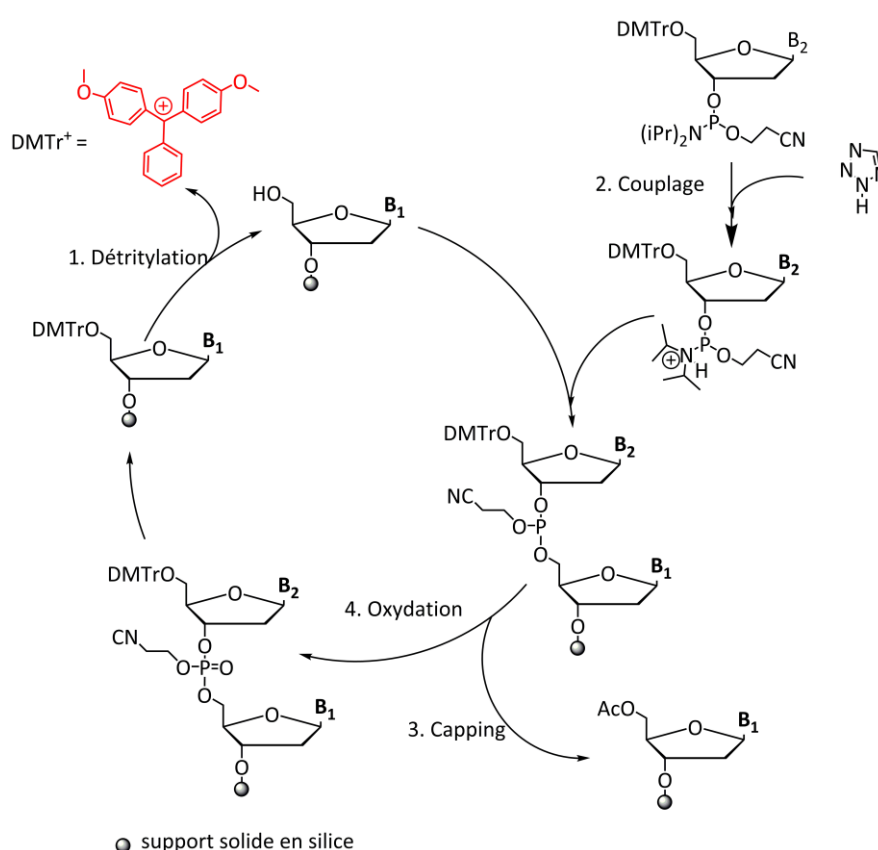


Figure 95. Mécanisme de synthèse d'oligonucléotides sur support également appelé chimie des phosphoramidites (B₁ : base 1, B₂ : base 2, DMTr : 4,4' –Diméthoxytrityle) (adapté de la référence ^[59]).

Le groupement 5'-hydroxyle du premier nucléotide (B_1) est protégé par un groupement acidolabile, le DMTr (4,4'- Diméthoxytrityle). La déprotection de l'hydroxyle à l'extrémité 5' va s'effectuer en présence d'acide trichloroacétique 3% dans du dichlorométhane. Ce qui libère un composé de couleur rouge. Cette étape s'appelle la détritylation.

Puis, le second nucléotide (B_2) est couplé à cet hydroxyle 5' par l'intermédiaire de son synthon phosphoramidite (20 eq) activé par du tétrazole dans de l'acétonitrile. On obtient un lien phosphite triester entre les nucléotides B_1 et B_2 . Afin d'éviter des réactions parasites, les phosphoramidites sont protégés sur le phosphate par un groupement cyanoéthyle et sur les amines exocycliques des bases dA, dC et dG par des groupements basolabiles de types acyle (benzoyle pour dA et dC et isobutyryle pour dG). Le rendement de cette étape est en moyenne de 98%.

Pour faciliter la purification, les hydroxyles 5' qui n'ont pas réagi sont bloqués, c'est ce qu'on appelle le « capping ». Cette étape évite l'élongation de séquences erronées.

Ce cycle de synthèse se termine par une étape d'oxydation du phosphite triester entre B_1 et B_2 en phosphate triester, en présence de diiode de concentration $0,02 \text{ mol.L}^{-1}$ préparé dans une solution de THF. À la fin de la synthèse, un traitement à la méthylamine (40% dans l'eau) permet de déprotéger les nucléobases et les groupements phosphates ainsi que de libérer l'oligonucléotide du support solide.

b. Purification des aptamères anti-cocaïne

Les aptamères mono-fragment et double-fragments ont été purifiés différemment car ils ne font pas la même longueur. L'aptamère mono-fragment a été purifié sur gel de polyacrylamide (PAGE : polyacrylamide gel electrophoresis) en conditions dénaturantes et les deux fragments de l'aptamère double-fragments par chromatographie HPLC en phase inverse.

Aptamère mono-fragment

Cet aptamère doit être purifié par PAGE en condition dénaturante car sa taille implique la possibilité de plusieurs repliements qui compliquent les purifications en HPLC (apparition de plusieurs pics correspondant aux différents repliements pour une même séquence).

Après avoir détaché l'oligonucléotide, une filtration est réalisée afin de séparer la résine de l'oligonucléotide. Ensuite l'éluat est évaporé pour retirer l'eau et la méthylamine.

Le produit est solubilisé dans 800 μL d'urée à 8M préparée dans de l'eau milli-Q. L'urée va dénaturer l'oligonucléotide.

L'électrophorèse est réalisé sur un gel de polyacrylamide (ratio 19 acrylamide:1 bisacrylamide) contenant de l'urée. Le mélange acrylamide / bisacrylamide dans le tampon TBE (Tris-borate 90 mmol.L^{-1} pH8, EDTA 2 mmol.L^{-1}) est préparé à 50 °C afin de solubiliser les réactifs. La polymérisation du gel est initié par l'ajout de TEMED (*N,N,N',N'*-tétraméthyléthylènediamine) et de persulfate d'ammonium (APS 10 %). Ensuite le gel est coulé entre les deux plaques de verre. Le TBE est utilisé comme tampon de migration.

La migration s'effectue sous une puissance de 60 W pendant 30 minutes puis à 10 W durant toute la nuit. La visualisation des oligonucléotides sur le gel se fait sous une lampe UV. Les bandes « intéressantes » sont alors découpées, broyées à l'aide d'un mortier et placées dans l'eau (30 mL d'eau milli-Q pour 5 mg de gel). Ce mélange va subir un choc thermique (-80°C à +100°C) afin de casser le gel. Puis cette mixture est centrifugée (2 min à 4 000 rpm) et le surnageant récupéré est filtré sur PVDF 0,450 μ . Les oligomères sont ensuite désalés pour éliminer l'urée présente en abondance sur une colonne ouverte d'exclusion stérique (on dépose 1mL de solution d'oligonucléotides sur la colonne d'exclusion, puis on élue avec de l'eau en faisant des aliquots de 1mL). Les fractions récupérés sont alors dosés par absorbance UV à une longueur d'onde de 260 nm ($\epsilon = 392\,900\text{ L.mol}^{-1}.\text{cm}^{-1}$). Seuls les aliquots présentant une bande d'absorbance à 260 nm sont conservés. Ces fractions sont ensuite lyophilisées et stockes à -21°C.

Une masse 1,1 mg d'aptamère mono-fragment est obtenu. La masse molaire du produit obtenu est de 11 992 g.mol^{-1} .

Aptamère double-fragments

Une fois l'oligonucléotide détaché du support utilisé pour la synthèse, il a été purifié par chromatographie HPLC phase inverse.

Cette purification repose sur les différences d'hydrophobicité des séquences d'oligonucléotides qui peuvent être entières ou tronquées. Ainsi les séquences entières

d'oligonucléotides seront retenues sur la colonne alors que les séquences tronquées seront éluées. Afin d'augmenter encore cette différence et ainsi faciliter la purification, le cycle de synthèse est arrêté juste avant la détrylation du dernier nucléotide, ainsi, la séquence entière porte un groupement DMTr (lipophile) tandis que les séquences tronquées n'en portent pas. En parallèle, une mesure par spectroscopie UV est réalisée afin de vérifier la présence de l'oligonucléotide désiré.

Une fois le produit désiré élué, celui-ci est séché puis solubilisé dans 300 μL d'acide acétique (80%) afin d'éliminer les groupements DMTr. Ensuite une extraction à l'éther est réalisée pour séparer les oligonucléotides du DMTr. Le produit obtenu est quantifié en faisant une mesure par spectroscopie UV à 260 nm ($\epsilon_{\alpha} = 259\,000 \text{ L.mol}^{-1}.\text{cm}^{-1}$; $\epsilon_{\beta} = 137\,900 \text{ L.mol}^{-1}.\text{cm}^{-1}$) et analysé par HPLC (Figure 96) et spectrométrie de masse (Figure 97).

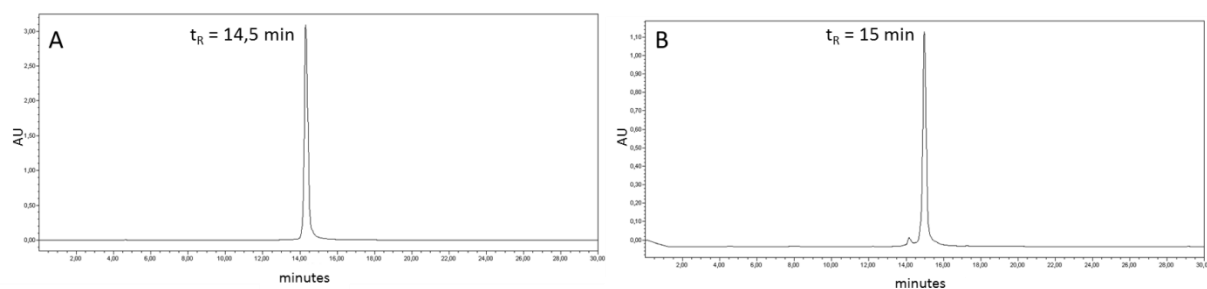


Figure 96. Chromatogramme après purification par HPLC de l'aptamère double-fragment. A. aptamère α et B. aptamère β .

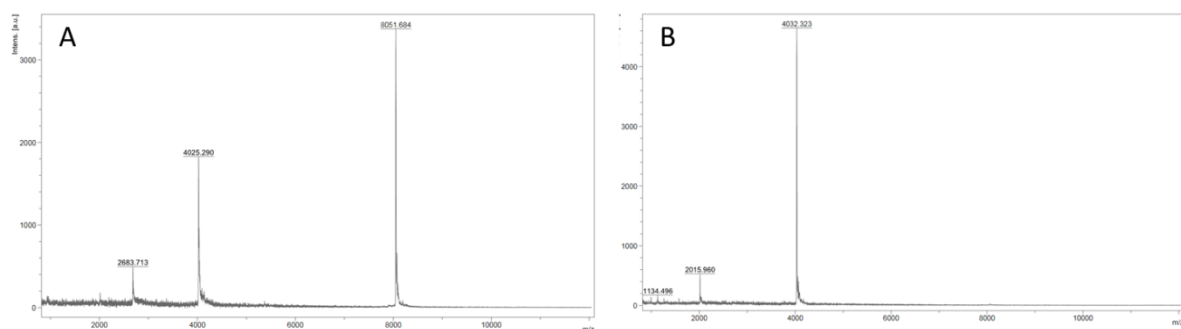


Figure 97. Analyse en spectrométrie de masse MALDI-ToF en mode négatif de l'aptamère double-fragment. A. aptamère α (m/z calc = 8050.2) et B. aptamère β (m/z calc = 4032.6)

3. Preuve de concept

a. Principe de l'aptacapteur

Aptamère mono-fragment

L'aptamère mono-fragment est composé de 38 nucléotides dont une partie est partiellement repliée. La présence de cocaïne induit un changement de conformation de

l'aptamère qui se replie entièrement autour de la molécule de cocaïne. Une structure schématique de cet aptamère est présentée Figure 98.

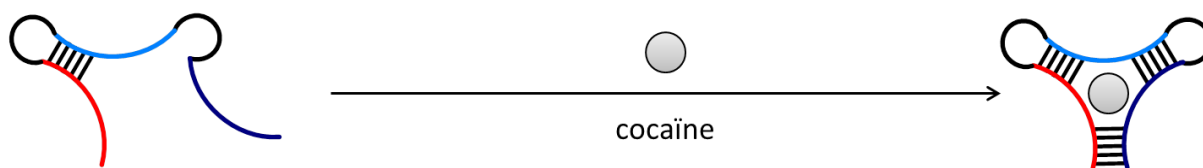


Figure 98. Structure de l'aptamère anti-cocaïne mono-fragment. La présence de cocaïne induit un changement de la conformation de l'aptamère.

Aptamère double-fragment

L'aptamère double-fragment est composé d'un long fragment de 26 nucléotides qu'on appellera aptamère α et d'un fragment plus court composé de 13 nucléotides qu'on appellera aptamère β . Les aptamères α et β forment une jonction à 3 voies uniquement en présence de cocaïne.

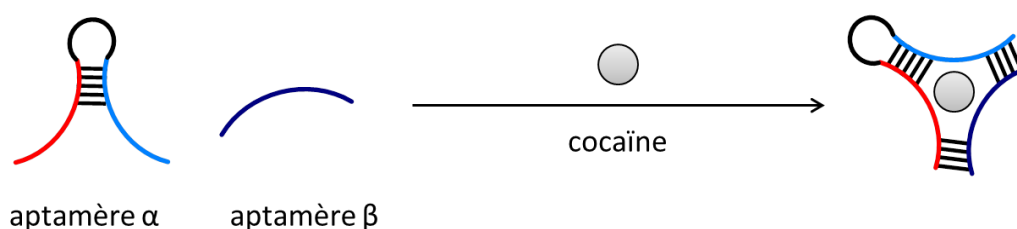


Figure 99. Structure de l'aptamère anti-cocaïne double-fragment. L'aptamère α est constitué de 26 nucléotides et l'aptamère β de 13 nucléotides. La présence de cocaïne induit la formation d'un aptamère à trois jonctions.

Pour élaborer un aptacapteur pour la détection de la cocaïne, nous avons choisi de débiter par une première étape d'accrochage de l'aptamère. Il s'agira de l'aptamère mono-fragment ou de la partie α de l'aptamère double-fragments. En effet, ceux-ci possèdent déjà une partie auto-hybridée qui peut permettre leur accrochage à la surface de l'électrode comme décrit précédemment. Puis, l'électrode est incubée avec la cocaïne dans le cas de l'aptamère mono-fragment (Figure 100A) et, avec la cocaïne et la partie β (Figure 100B), dans le cas de l'aptamère double-fragment. Le principe de ces deux aptacapteurs est représenté Figure 100.

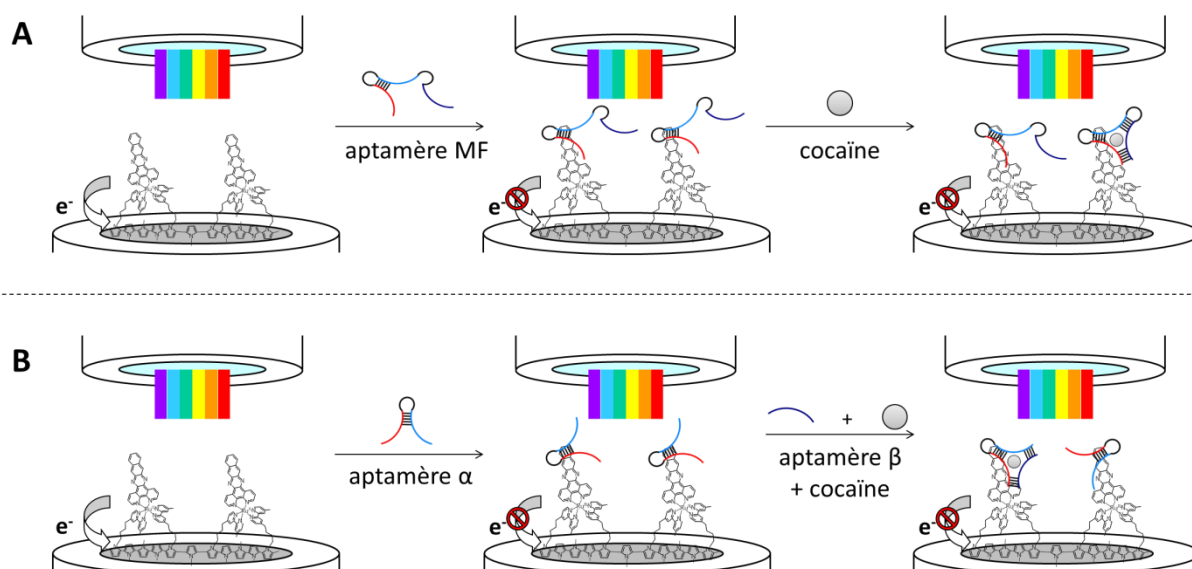


Figure 100. Illustration du protocole utilisé pour l'élaboration de l'aptacapteur. (A) Le photocourant est mesuré sur une électrode de platine fonctionnalisée avec (a) le poly-[Ru(bpy-pyrrole)₂dppn]₂⁺ qui est ensuite incubé successivement avec (b) l'aptamère mono-fragment et (c) la cocaïne. (B) Le photocourant est mesuré sur une électrode de platine fonctionnalisée avec (a) le poly-[Ru(bpy-pyrrole)₂dppn]²⁺ qui est ensuite incubé avec (b) l'aptamère α puis avec (c) l'aptamère β et la cocaïne

Avant l'élaboration de la courbe d'étalonnage, plusieurs paramètres expérimentaux tels que la nature du tampon de mesure et le temps d'incubation permettant l'accrochage du fragment partiellement hybridé, ont tout d'abord été optimisés.

b. Optimisation des conditions de mesure du photocourant

Tampon PBS (Phosphate Buffer Saline) $10^{-2} \text{ mol.L}^{-1}$ pH 7,4, KCl $2,7 \cdot 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$ et de NaCl $0,137 \text{ mol.L}^{-1}$

Pour élaborer le biocapteur, dans un premier temps, l'aptamère mono-fragment est préparé quelques heures avant les mesures de photoélectrochimie. Pour cela, l'aptamère est solubilisé dans une solution de PBS $0,01 \text{ mol.L}^{-1}$, pH = 7,4 puis chauffé à 90°C pendant 3 minutes puis on le laisse refroidir jusqu'à atteindre la température ambiante.

La solution de tampon phosphate salin PBS a été utilisé comme tampon de mesure. Ce tampon est composé de phosphate $10^{-2} \text{ mol.L}^{-1}$ pH 7,4, KCl $2,7 \cdot 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$ et de NaCl $0,137 \text{ mol.L}^{-1}$. Nous souhaitons vérifier que ce tampon est adapté pour les mesures et permette un repliement optimal de l'aptamère en présence de cocaïne. Pour cela, une mesure de photocourant dans une solution d'ascorbate 10 mmol.L^{-1} préparée dans la solution tampon PBS est réalisée avec le film de poly-[Ru(bpy-pyrrole)₂(dppn)]²⁺.

Dans un second temps, l'électrode est incubée avec 40 μL d'aptamère mono-fragment de concentration $6,40 \times 10^{-10} \text{ mol.L}^{-1}$ (concentration identique à la concentration d'ADN sonde utilisé précédemment) pendant 30 minutes. À la fin de l'incubation, l'électrode est rincée et le photocourant mesuré (Figure 101). Au vu des résultats obtenus, on remarque qu'il n'y a pas de diminution de photocourant avant et après incubation du film de $\text{poly}[\text{Ru}(\text{bpy-pyrrole})_2(\text{dppn})]^{2+}$ avec l'aptamère mono-fragment, indiquant que l'aptamère mono-fragment ne s'est pas accroché à la surface du $\text{poly}[\text{Ru}(\text{bpy-pyrrole})_2(\text{dppn})]^{2+}$.

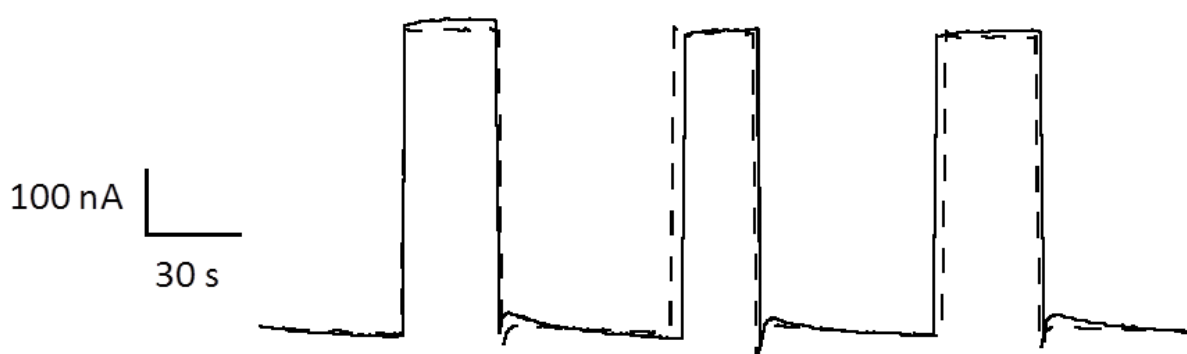


Figure 101. Mesures de photocourant d'un film de $\text{poly}[\text{Ru}(\text{bpy-pyrrole})_2(\text{dppn})]^{2+}$ (—) avant et (---) après incubation pendant 30 minutes dans une solution d'aptamère mono-fragment de concentration $6,40 \times 10^{-10} \text{ mol.L}^{-1}$. Le film de $\text{poly}[\text{Ru}(\text{bpy-pyrrole})_2(\text{dppn})]^{2+}$ est formé par chronocoulométrie ($E = 0,75 \text{ V}$ et $Q = 2,5 \text{ mC.cm}^{-2}$). Les mesures de photocourant sont réalisées dans une solution d'ascorbate 10 mmol.L^{-1} préparée dans du PBS $0,01 \text{ mol.L}^{-1}$, $E = 0 \text{ V}$ vs. Ag/AgCl .

Pour vérifier cela, l'électrode modifiée par le film de $\text{poly}[\text{Ru}(\text{bpy-pyrrole})_2(\text{dppn})]^{2+}$ est incubée avec 40 μL d'une solution contenant $6,40 \times 10^{-10} \text{ mol.L}^{-1}$ d'aptamère mono-fragment et $2 \times 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$ de cocaïne. Après rinçage de l'électrode, le photocourant est mesuré. Les résultats obtenus sont présentés Figure 102.

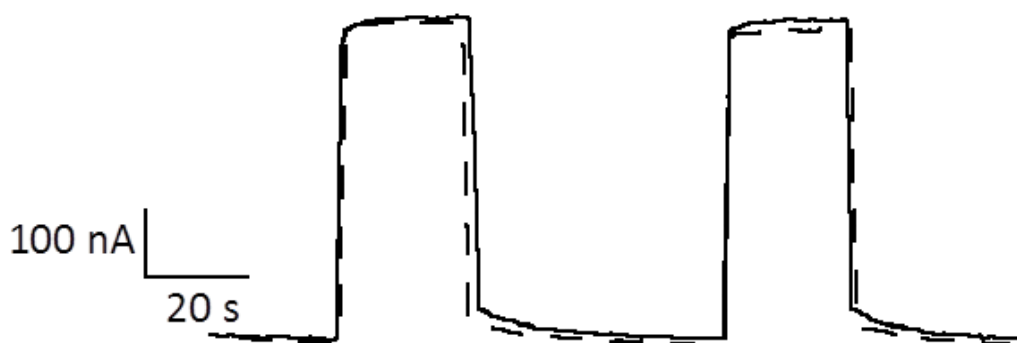


Figure 102. Mesures du photocourant d'un film de $\text{poly}[\text{Ru}(\text{bpy-pyrrole})_2(\text{dppn})]^{2+}$ (—) avant et (---) après incubation dans une solution d'aptamère mono-fragment de concentration $6,40 \times 10^{-10} \text{ mol.L}^{-1}$ et de cocaïne de concentration $2 \times 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$. Le film de $\text{poly}[\text{Ru}(\text{bpy-pyrrole})_2(\text{dppn})]^{2+}$ est formé par chronocoulométrie ($E = 0,75 \text{ V}$ et $Q = 2,5 \text{ mC.cm}^{-2}$). Les mesures de photocourant sont réalisées dans une solution d'ascorbate 10 mmol.L^{-1} préparée dans du PBS $0,01 \text{ mol.L}^{-1}$, $E = 0 \text{ V}$ vs. Ag/AgCl .

On remarque qu'il n'y a pas de différence de photocourant avant et après incubation du film de polymère dans une solution contenant l'aptamère et la cocaïne, ce qui pourrait être attribué à un mauvais repliement de l'aptamère.

Tampon Tris-HCl 0,2 mol.L⁻¹ pH 7,4 contenant 2 mmol.L⁻¹ de MgCl₂

D'après Stojanovic et al,^[60] la présence de Mg²⁺ dans le tampon peut induire des changements de conformation de l'aptamère. Après une phase d'optimisation, ces auteurs ont mis au point la composition d'un tampon favorisant le repliement de l'aptamère pour la détection de cocaïne.^[60,61] Ce tampon est composé de Tris-HCl 20 mmol.L⁻¹ pH 7,4, de NaCl 140 mmol.L⁻¹ et de MgCl₂ 2mmol.L⁻¹. Pour simplifier l'écriture, ce tampon sera appelé tampon Tris-HCl 0,2 mol.L⁻¹ contenant du MgCl₂.

Les premiers tests réalisés consistent à mesurer plusieurs fois la stabilité du photocourant du film de poly-[Ru(bpy-pyrrole)₂(dppn)]²⁺ dans une solution d'ascorbate 10 mmol.L⁻¹ préparée dans du tampon Tris-HCl contenant du MgCl₂ à la concentration préconisée dans la littérature. Les chronoampérogrammes obtenus sont présentés Figure 103A.

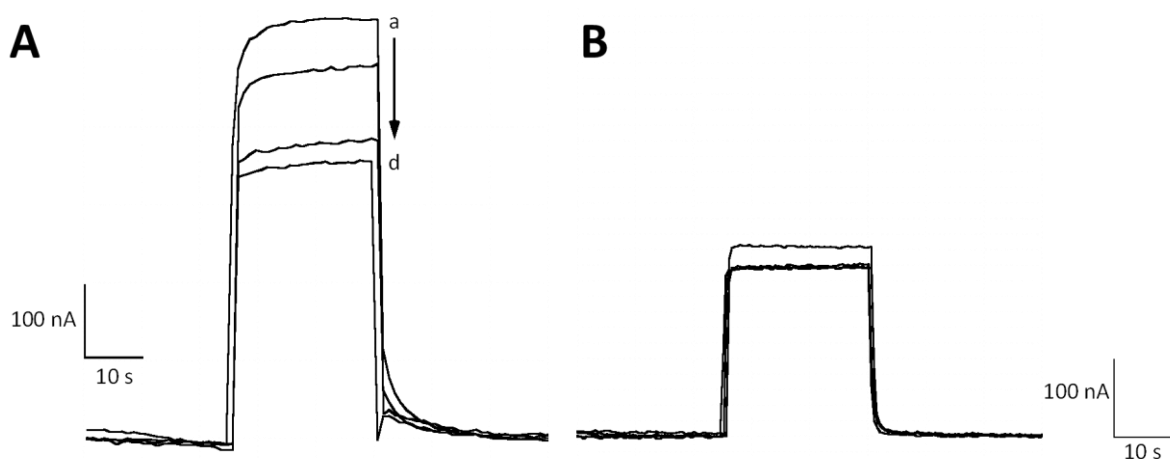


Figure 103. (A) Mesure de photocourant d'un film de poly-[Ru(bpy-pyrrole)₂(dppn)]²⁺ après conservation de l'électrode modifiée avec le polymère pendant (a). 0, (b). 30, (c). 60 et (d). 90 minutes dans le tampon Tris-HCl 0,2 mol.L⁻¹ pH 7,4 contenant 2 mmol.L⁻¹ de MgCl₂. (B) Mesures du photocourant d'un film de poly-[Ru(bpy-pyrrole)₂(dppn)]²⁺ conservé pendant 15 heures dans du tampon tris-HCl 0,2 mol.L⁻¹ pH 7,4 contenant 2 mmol.L⁻¹ de MgCl₂ et rincé trois fois 15 minutes dans ce même tampon. Le film de poly-[Ru(bpy-pyrrole)₂(dppn)]²⁺ est formé par chronocoulométrie ($E = 0,75 \text{ V}$ et $Q = 2,5 \text{ mC.cm}^{-2}$). Les mesures de photocourant sont réalisées dans une solution d'ascorbate 10 mmol.L⁻¹ préparée dans tampon tris-HCl 0,2 mol.L⁻¹ pH 7,4 contenant 2 mmol.L⁻¹ de MgCl₂, $E = 0 \text{ V}$ vs. Ag/AgCl.

Sur la Figure 103A, on voit que le photocourant diminue de 65 nA après avoir passé 30 minutes dans le tampon tris-HCl 0,2 mol.L⁻¹ pH 7,4 contenant du Mg²⁺. Au bout de 60 minutes, la différence de photocourant est de 100 nA. Et au bout de 90 minutes, la diminution de photocourant par rapport à la mesure précédente est de 20 nA, soit une valeur de photocourant de 355 nA. Lorsque que l'électrode fonctionnalisée avec le polymère est gardée une nuit, soit 15 heures, dans le tampon tris-HCl 0,2 mol.L⁻¹ pH 7,4 contenant du Mg²⁺ (Figure 103B), la valeur de photocourant obtenue est plus faible (215 nA) mais reste stable dans le temps. En effet, en effectuant trois fois la mesure, la valeur de photocourant mesurée est identique (Figure 41B). Ce tampon perturbe la stabilité du signal photoélectrochimique et il faut un temps d'incubation de 15 heures pour obtenir un signal photoélectrochimique stable. Ceci peut être causé par des interactions ioniques au sein du polymère du fait de la présence de MgCl₂. Dans la suite de l'étude, afin d'obtenir un signal stable et reproductible les électrodes, sont stockées 15 heures dans le tampon tris-HCl 0,2 mol.L⁻¹ pH 7,4 contenant du MgCl₂.

C'est donc avec le tampon Tris-HCl 0,2 mol.L⁻¹ pH 7,4 contenant du Mg²⁺ que la cocaïne et l'aptamère seront préparées dans la suite de ce chapitre et que l'accrochage de l'aptamère mono-fragment et de la partie α de l'aptamère double-fragments sera effectué.

c. Accrochage de l'aptamère sur les électrodes modifiées par le film de poly-([Ru(bpy-pyrrole)₂(dpnn)]²⁺

Avant d'essayer de détecter la cocaïne, il nous a semblé intéressant, dans un premier temps, d'optimiser la concentration d'aptamère mono-fragment et d'aptamère α à utiliser.

Pour cela, un film de poly-(Ru^{II}(dppn)) a été incubé avec 40 μL d'une solution d'aptamère mono-fragment (Figure 104A) ou d'aptamère α (Figure 104B) pendant 30 minutes à température ambiante. La gamme de concentrations d'aptamère mono-fragment testé varie de 6,40 x 10⁻¹² à 6,40 x 10⁻⁰⁸ mol.L⁻¹ et celle de l'aptamère α s'étend de 10⁻¹² à 10⁻⁰⁴ mol.L⁻¹. Puis les électrodes sont rincées 2 fois pendant 15 minutes sous agitation dans du tampon tris-HCl 0,2 mol.L⁻¹ pH 7,4 contenant 2 mmol.L⁻¹ de MgCl₂ avant de mesurer le photocourant dans une solution d'ascorbate 10 mmol.L⁻¹ préparée dans du tampon tris-HCl 0,2 mol.L⁻¹ pH 7,4 contenant 2 mmol.L⁻¹ de MgCl₂.

Pour faciliter l'analyse de ces résultats, on trace $\Delta I / I_0$ en fonction de la concentration soit en aptamère mono-fragment (Figure 104C) soit en aptamère α (Figure 104D).

En analysant le graphe représenté Figure 104 C, on note que la valeur du rapport $\Delta I / I_0$ augmente pour des concentrations en aptamère comprises entre $6,40 \times 10^{-12}$ et $6,40 \times 10^{-9}$ mol.L⁻¹, pour atteindre une valeur maximale $\Delta I / I_0$ de 0,13 pour une concentration d'aptamère égale à $6,40 \times 10^{-9}$ mol.L⁻¹. Puis, lorsque le film est incubé avec l'aptamère à une concentration de $6,40 \times 10^{-8}$ mol.L⁻¹, le rapport $\Delta I / I_0$ diminue pour atteindre la valeur 0,06. Ainsi la concentration d'aptamère mono-fragment de $6,40 \times 10^{-9}$ mol.L⁻¹, qui est la concentration à laquelle la valeur $\Delta I / I_0$ est maximale, est la concentration choisie pour élaborer l'aptacapteur à cocaïne.

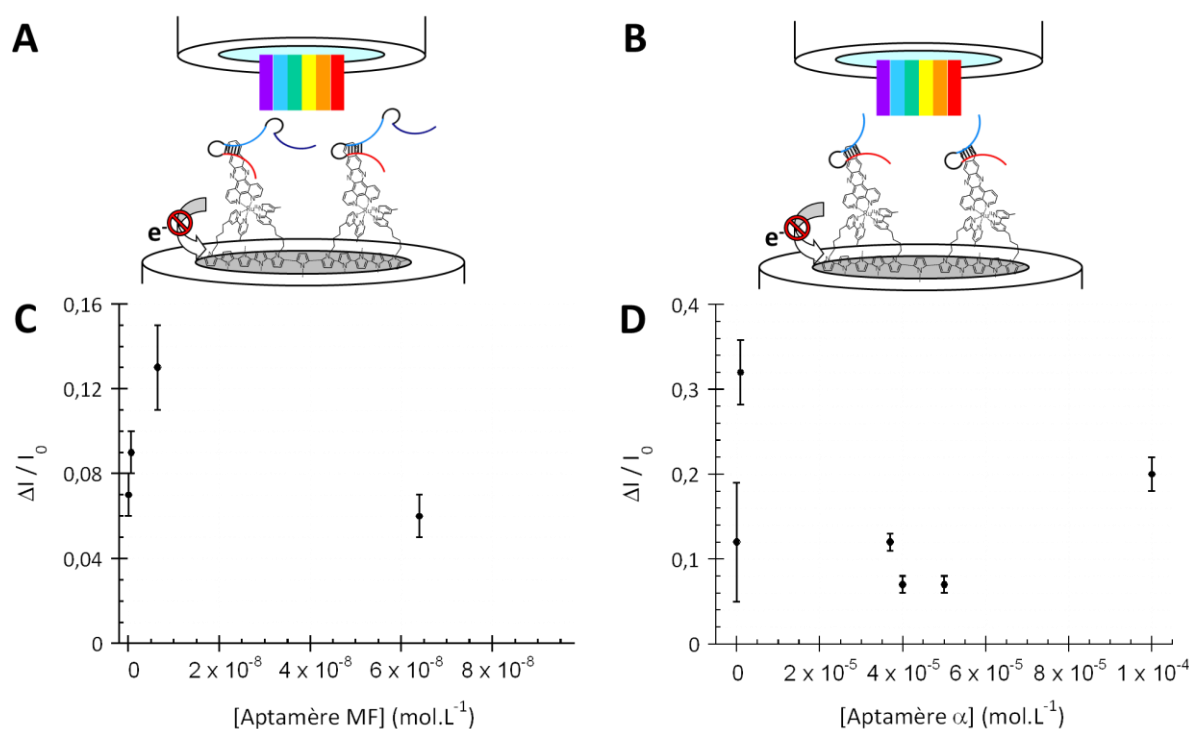


Figure 104. Schéma du film de poly-(Ru^{II}(dppn)) sur lequel (A) l'aptamère mono-fragment et (B) l'aptamère α est intercalé. Variation de $\Delta I / I_0$ en fonction de la concentration (C) d'aptamère mono-fragment ou (D) d'aptamère α . Le film de poly-[Ru(bpy-pyrrole)₂(dppn)]²⁺ est formé par chronocoulométrie ($E = 0,75$ V et $Q = 2,5$ mC.cm⁻²). Les mesures de photocourant sont réalisées dans une solution d'ascorbate 10 mmol.L⁻¹ préparée dans tampon tris-HCl 0,2 mol.L⁻¹ pH 7,4 contenant 2 mmol.L⁻¹ de MgCl₂, $E = 0$ V vs. Ag/AgCl.

De la même façon, en analysant la courbe présentée Figure 104D, la valeur du rapport $\Delta I / I_0$ atteint une valeur maximale de 0,33 pour une concentration d'aptamère α de 10^{-6} mol.L⁻¹ et

décroit pour des concentrations supérieures. Ainsi, afin d'avoir une diminution de la valeur de photocourant significative, une concentration de 10^{-06} mol.L⁻¹ pour l'aptamère α a été choisie pour réaliser l'aptacapteur à cocaïne.

Il est important de noter que nous avons testé aussi la stabilité de l'intercalation des aptamères sur le film de polymère. On constate l'obtention d'un photocourant stable après rinçage dans du tampon tris-HCl 0,2 mol.L⁻¹ pH 7,4 contenant 2 mmol.L⁻¹ de MgCl₂ pendant 60 minutes.

d. Tests préliminaires en présence de cocaïne

Avec l'aptamère mono-fragment

L'intercalation de l'aptamère mono-fragment de concentration $6,40 \times 10^{-09}$ mol.L⁻¹ est dans un premier temps mesuré. Les valeurs de $\Delta I / I_0$ sont présentées Tableau 15 où ΔI représente la différence de photocourant mesurée entre le film de polymère et le film de polymère fonctionnalisé avec l'aptamère MF et I_0 la valeur de photocourant du film de polymère.

Tableau 15. Valeurs de $\Delta I / I_0$ obtenues pour 6 électrodes avec une concentration d'aptamère mono-fragment de $6,40 \times 10^{-09}$ mol.L⁻¹

$\Delta I / I_0$	0,16	0,12	0,14	0,14	0,21	0,11
------------------	------	------	------	------	------	------

Ainsi, on peut dire que la diminution induite par l'intercalation de l'aptamère mono-fragment sur le film de poly-[Ru(bpy-pyrrole)₂dppn]²⁺ est reproductible puisque la valeur de $\Delta I / I_0$ est de $0,15 \pm 0,02$.

Le film de poly-[Ru(bpy-pyrrole)₂dppn]²⁺ fonctionnalisé avec l'aptamère mono-fragment est incubé avec différentes concentrations de cocaïne. Les valeurs de $\Delta I / I_{apt}$ calculées sont présentées dans le Tableau 16 où ΔI représente la différence de photocourant mesurée entre le film de polymère fonctionnalisé avec l'aptamère MF et le film de polymère fonctionnalisé avec l'aptamère MF avec la cocaïne et I_{apt} étant la valeur de photocourant du film de polymère fonctionnalisé avec l'aptamère MF.

Tableau 16. Valeurs de $\Delta I / I_{\text{apt}}$ obtenues pour différentes concentrations de cocaïne lorsque le film de poly-(Ru^{II}(dppn)) est fonctionnalisé avec $6,40 \times 10^{-09}$ mol.L⁻¹ d'aptamère mono-fragment.

[cocaïne] (mol.L ⁻¹)	1×10^{-08}	1×10^{-06}	1×10^{-04}	1×10^{-03}
$\Delta I / I_{\text{apt}}$	$0,08 \pm 0,01$	$0,13 \pm 0,02$	$0,06 \pm 0,02$	$0,04 \pm 0,02$

On remarque que les variations de $\Delta I / I_{\text{apt}}$ ne permettent pas l'obtention d'une courbe d'étalonnage. Ces résultats n'étant pas concluants, nous nous sommes donc tournés vers l'aptamère double-fragment afin d'avoir une meilleure reproductibilité des mesures.

Avec l'aptamère double-fragment

Pour vérifier que l'aptamère double-fragment était capable de s'intercaler sur le film de polymère, après reconnaissance de la cocaïne, nous avons procédé en plusieurs étapes.

Tout d'abord, le photocourant du film de poly-[Ru(bpy-pyrrole)₂dppn]²⁺ est mesuré (Figure 105a). Un photocourant de 320 nA est obtenu. Ensuite, l'électrode est incubée avec 40 µL d'aptamère α 10^{-04} mol.L⁻¹ pendant 30 minutes, puis rincée avant de mesurer le photocourant (265 nA) (Figure 105b). Donc une diminution de 55 nA, due à l'intercalation de l'aptamère α sur le film de polymère, est observée.

Ensuite cette même électrode a été incubée avec 40 µL d'une solution d'aptamère β de concentration 10^{-04} mol.L⁻¹ pendant 30 minutes. Puis l'électrode est rincée 2 fois pendant 15 minutes avant de mesurer le photocourant dans les mêmes conditions que précédemment. La valeur du photocourant mesuré est de 258 nA (Figure 105 c). On remarque une diminution de 7 nA de la valeur du photocourant par rapport à l'électrode fonctionnalisée avec l'aptamère α . Donc l'incubation du film de polymère avec l'aptamère β n'induit pas de diminution de photocourant en absence de cocaïne.

Pour finir, l'électrode est incubée ensuite pendant 30 minutes avec 40 µL d'une solution d'aptamère β de concentration 10^{-04} mol.L⁻¹ et de cocaïne. L'électrode est rincée avant de mesurer le photocourant dans les mêmes conditions que précédemment (Figure 105d). La valeur du photocourant mesuré est de 220 nA. Une diminution de 15 % du photocourant soit 38 nA est observé. Cette diminution de photocourant est due à la formation de l'aptamère anti-cocaïne (jonction à 3 voies) induite par la présence de cocaïne. On aurait pu s'attendre à

une diminution de photocourant plus importante, mais étant donné la forte concentration d'aptamère testée, il est possible que la surface du polymère soit suffisamment recouverte d'aptamère α pour induire un encombrement de la surface pouvant gêner l'interaction entre l'aptamère α et β pour former l'aptamère anti-cocaïne. Ce paramètre devra être pris en considération pour optimiser le biocapteur. Et par conséquent, il est probable que certains aptamères α ne soit pas associés aux aptamères β présents dans la solution d'incubation.

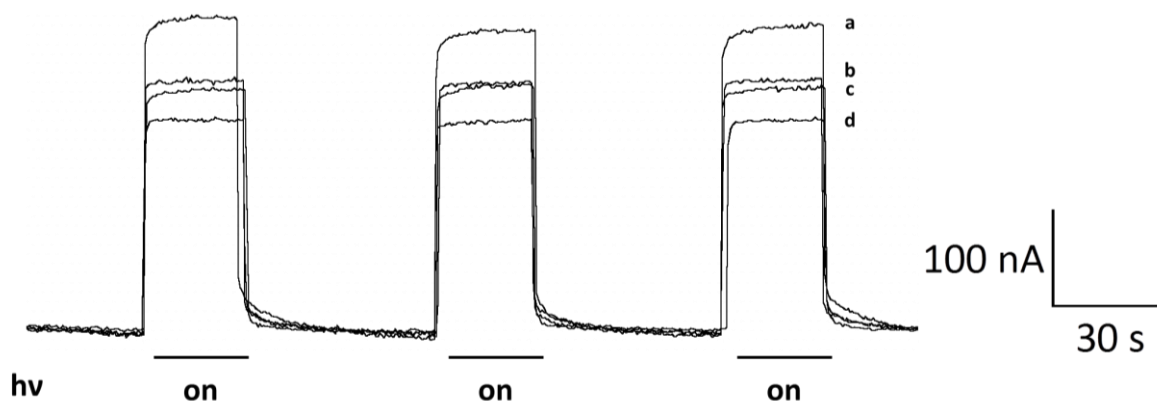


Figure 105. Photocourant mesuré sur une électrode de platine fonctionnalisée avec (a). du poly-[Ru(bpy-pyrrole)₂dppn]²⁺, (b). après incubation avec 10⁻⁰⁴ mol.L⁻¹ d'aptamère α , (c). 10⁻⁰⁴ mol.L⁻¹ d'aptamère β et (d). 10⁻⁰⁴ mol.L⁻¹ d'aptamère β + 360 μ M de cocaïne. Le film de poly-[Ru(bpy-pyrrole)₂(dppn)]²⁺ est formé par chronocoulométrie ($E = 0,75$ V et $Q = 2,5$ mC.cm⁻²). Les mesures de photocourant sont réalisées dans une solution d'ascorbate 10 mmol.L⁻¹ préparée dans tampon tris-HCl 0,2 mol.L⁻¹ pH 7,4 contenant 2 mmol.L⁻¹ de MgCl₂, $E = 0$ V vs. Ag/AgCl

4. Courbe d'étalonnage de la détection de cocaïne

a. Détection de cocaïne en présence de 1 μ mol L⁻¹ d'aptamère

Pour réaliser la gamme d'étalonnage, la valeur du photocourant, noté I_0 , du film de poly-[Ru(bpy-pyrrole)₂(dpnn)]²⁺, est mesuré dans un premier temps. Puis dans un second temps, l'électrode est incubée pendant 30 minutes avec 40 μ L d'une solution contenant 1 μ mol.L⁻¹ d'aptamère α , 1 μ mol.L⁻¹ d'aptamère β et différentes concentrations de cocaïne (variant de 10⁻⁶ à 10⁻³ mol.L⁻¹). Ensuite, l'électrode est rincée 2 fois 30 minutes sous agitation dans du tampon tris-HCl 0,2 mol.L⁻¹ pH 7,4 contenant 2 mmol.L⁻¹ de MgCl₂ avant de mesurer le photocourant de cette électrode. La diminution de photocourant induite par l'intercalation de l'aptamère anti-cocaïne après reconnaissance de la cocaïne est appelé ΔI .

Les chronoampérogrammes obtenus dans une solution d'ascorbate 10 mmol.L⁻¹ préparée dans du tampon tris-HCl 0,2 mol.L⁻¹ pH 7,4 contenant 2 mmol.L⁻¹ de MgCl₂ sont présentés

Figure 106A. Nous pouvons remarquer que la valeur de photocourant mesuré diminue en présence de concentrations croissantes en cocaïne pour atteindre une valeur de 282 nA pour une concentration de 10^{-3} mol. L⁻¹ en cocaïne ; ceci se traduit par une différence de photocourant ΔI de 71 nA. Cette diminution de photocourant est assez faible malgré la forte concentration de cocaïne testée.

La Figure 106B représente la courbe d'étalonnage de la cocaïne. La limite de détection est obtenue pour une valeur de concentration de 1×10^{-6} mol.L⁻¹ avec une valeur de $(\Delta I/\Delta I_{\max}) = 0,06$.

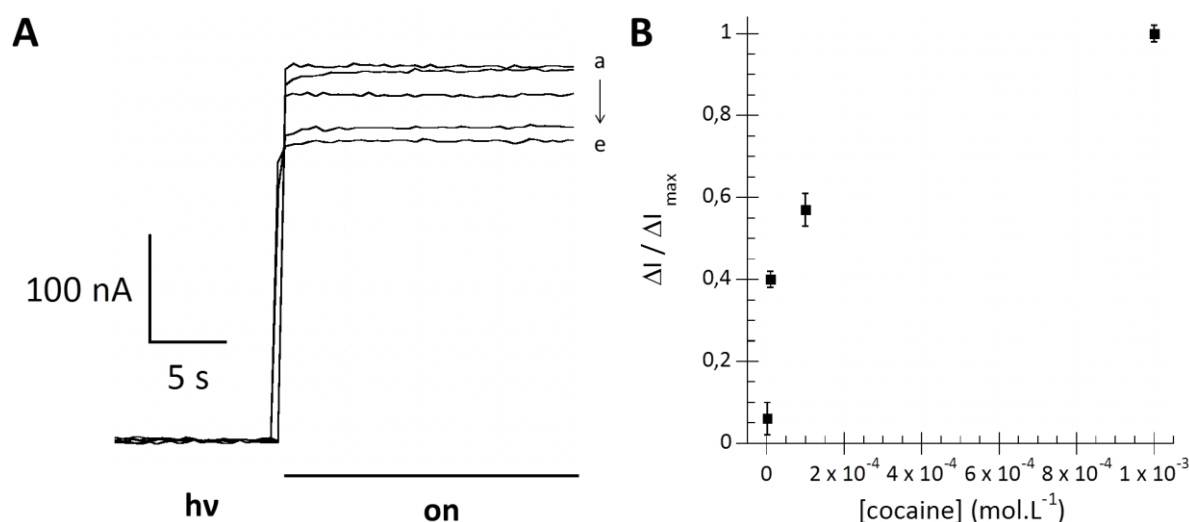


Figure 106. A. Photocourant mesuré sur une électrode de platine fonctionnalisée avec (a). du poly-[Ru(bpy-pyrrole)₂dppn]²⁺ incubée avec une solution d'aptamère α et d'aptamère β de concentration 1 μ mol.L⁻¹ et différentes concentrations de cocaïne : (b). 1×10^{-6} mol.L⁻¹, (c). 10^{-5} mol.L⁻¹, (d). 10^{-4} mol.L⁻¹ et (e). 10^{-3} mol.L⁻¹. Le film de poly-[Ru(bpy-pyrrole)₂(dppn)]²⁺ est formé par chronocoulométrie ($E = 0,75$ V et $Q = 2,5$ mC.cm⁻²). Les mesures de photocourant sont réalisées dans une solution d'ascorbate 10 mmol.L⁻¹ préparée dans tampon tris-HCl 0,2 mol.L⁻¹ pH 7,4 contenant 2 mmol.L⁻¹ de MgCl₂, $E = 0$ V vs. Ag/AgCl. B. Courbe d'étalonnage de la cocaïne par l'aptamère anti-cocaïne double-fragment (1 μ mol.L⁻¹). Les barres d'erreurs ont été calculées sur 3 électrodes.

Afin d'améliorer les performances du biocapteur et de diminuer la concentration de surface en aptamère α qui pourrait gêner l'interaction avec l'aptamère β , comme vu dans le paragraphe précédent, nous avons choisi de diviser la concentration d'aptamère par 10.

b. Détection cocaïne en présence de 0,1 $\mu\text{mol L}^{-1}$ d'aptamère

Pour réaliser ce nouvel aptacapteur dans des conditions expérimentales différentes avec des concentrations d'aptamère α et β de 0,1 $\mu\text{mol.L}^{-1}$, on utilise le même protocole et le même formalisme que ceux décrits précédemment.

Les chronoampérogrammes obtenus dans une solution d'ascorbate 10 mmol.L^{-1} sont présentés Figure 107A. Nous pouvons remarquer les valeurs de photocourant diminuent de 398 nA à 218 nA pour des concentrations en cocaïne comprises entre 0 mol. L^{-1} et 10^{-4} mol. L^{-1} , ce qui se traduit par une différence de photocourant mesurée ΔI de 180 nA.

Une augmentation de 2,5 fois a donc pu être obtenue si l'on compare cette valeur de 180 nA à celle mesurée précédemment avec une concentration de 1 $\mu\text{mol. L}^{-1}$ d'aptamère α et β qui était de 71 nA.

Par ailleurs, en traçant la courbe d'étalonnage, nous pouvons remarquer que pour une concentration en cocaïne de 1 $\mu\text{mol.L}^{-1}$, la valeur de $\Delta I / \Delta I_{\text{max}}$ est de 0,48 alors, qu'elle était de 0,06 avec une concentration d'aptamère de 1 $\mu\text{mol.L}^{-1}$. Dans le cas précédent, la concentration de 10^{-6} mol.L^{-1} en cocaïne correspondait à la limite de détection alors que dans ce paragraphe, c'est la plus petite valeur testée à ce jour. Ces informations nous indiquent que la limite de détection en cocaïne pourrait certainement être encore améliorée en utilisant des concentrations inférieures à 10^{-6} mol.L^{-1} .

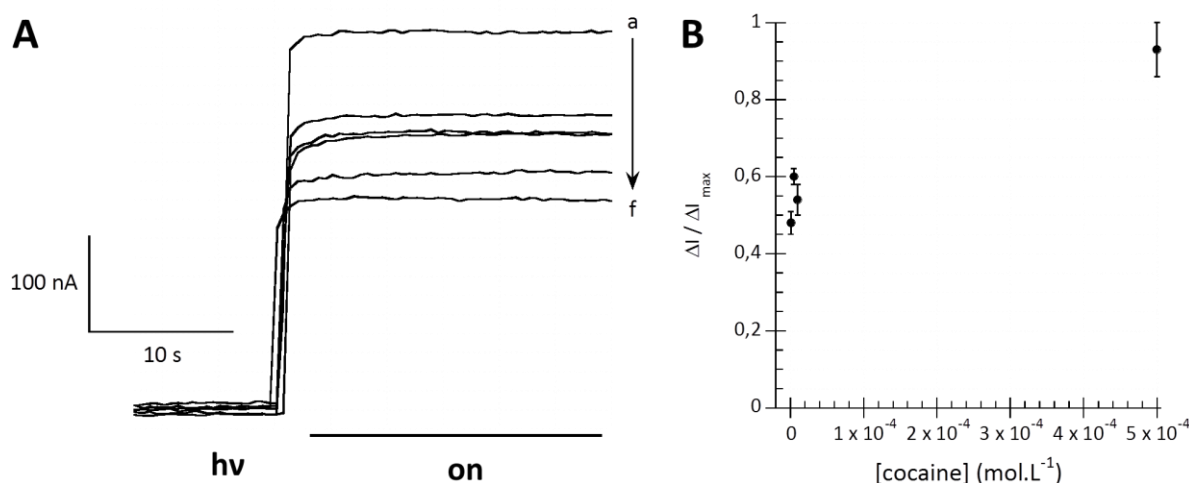


Figure 107. A. Photocourant mesuré sur une électrode de platine fonctionnalisée avec (a). du poly-[Ru(bpy-pyrrole)₂dppn]²⁺ incubée avec une solution d'aptamère α et β de concentration 0,1 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ et avec différentes concentrations de cocaïne : (b). $1 \times 10^{-6} \text{ mol.L}^{-1}$, (c). $5 \times 10^{-6} \text{ mol.L}^{-1}$, (d). $1 \times 10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$, (e). $5 \times 10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$ et (f). $1 \times 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$. Le film de poly-[Ru(bpy-pyrrole)₂(dppn)]²⁺ est formé par chronocoulométrie ($E = 0,75 \text{ V}$ et $Q = 2,5 \text{ mC.cm}^{-2}$). Les mesures de photocourant sont réalisées dans une solution d'ascorbate 10 mmol.L⁻¹ préparée dans tampon tris-HCl 0,2 mol.L⁻¹ pH 7,4 contenant 2 mmol.L⁻¹ de MgCl₂, $E = 0 \text{ V}$ vs. Ag/AgCl. B. Courbe d'étalonnage de la cocaïne par l'aptamère anti-cocaïne double-fragment (0,1 $\mu\text{mol.L}^{-1}$). Les barres d'erreurs ont été calculées sur 3 électrodes.

Le fait donc de diminuer la concentration d'aptamère à la surface de l'électrode permet d'améliorer la limite de détection. En effet, la gêne stérique pour que le complexe aptamère double fragment – cocaïne se forme doit être moins importante.

c. Mesures en présence d'interférents

Un test a été réalisé en présence d'interférent afin de vérifier la spécificité de l'aptamère double-fragment pour la cocaïne. Un des interférents choisi est le glucose [58] à une concentration de $10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$ car celui-ci se retrouve fréquemment dans les échantillons biologiques.

La solution de glucose a été préparée dans du tampon tris-HCl 0,2 mol.L⁻¹ pH 7,4 contenant 2 mmol.L⁻¹ de MgCl₂. Comme précédemment les photocourants ont été mesurés pour un film de poly-[Ru(bpy-pyrrole)₂(dppn)]²⁺ (Figure 108a) puis pour le film de polymère modifié avec 0,1 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ d'aptamère α et β en présence de 1 mmol.L⁻¹ de glucose (Figure 108b). Les chronoampérogrammes obtenus sont présentés Figure 108.

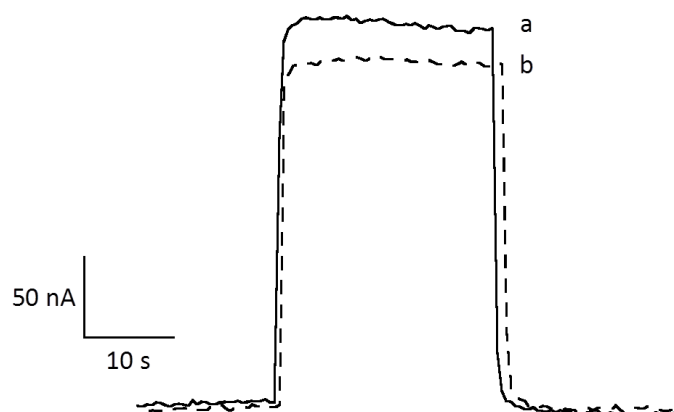


Figure 108. Photocourant mesuré sur une électrode de platine fonctionnalisée avec du poly-[Ru(bpy-pyrrole)₂dppn]²⁺ puis après incubation avec (b). une solution d'aptamère α et β de concentration 0,1 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ et 1 mmol.L^{-1} de glucose. Le film de poly-[Ru(bpy-pyrrole)₂(dppn)]²⁺ est formé par chronocoulométrie ($E = 0,75 \text{ V}$ et $Q = 2,5 \text{ mC.cm}^{-2}$). Les mesures de photocourant sont réalisées dans une solution d'ascorbate 10 mmol.L^{-1} préparée dans tampon tris-HCl 0,2 mol.L^{-1} pH 7,4 contenant 2 mmol.L^{-1} de MgCl_2 , $E = 0 \text{ V}$ vs. Ag/AgCl.

On remarque qu'il y a une diminution de photocourant de 25 nA lorsque l'électrode est incubée avec l'aptamère double-fragment et le glucose qui pourrait être due à l'intercalation d'une faible quantité d'aptamère α sur le film de polymère. En comparant ce résultat à celui obtenu précédemment pour une concentration de cocaïne de $10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$ où la diminution de photocourant était de 180 nA, on peut dire que l'aptamère anti-cocaïne double-fragments est spécifique de la cocaïne.

5. Comparaison des deux courbes d'étalonnage obtenues

Dans le but de décrire les interactions entre le poly-[Ru(bpy-pyrrole)₂dppn]²⁺ et l'aptamère anti-cocaïne double-fragments, les données expérimentales sont analysées en utilisant les isothermes de Langmuir et Langmuir-Freundlich.

a. Traitement des données expérimentales par l'isotherme de Langmuir

Dans un premier temps, les données expérimentales sont analysées par l'isotherme de Langmuir. En considérant que $\Delta I / \Delta I_{\text{max}}$ est le taux de recouvrement du poly-[Ru(bpy-pyrrole)₂dppn]²⁺ par l'aptamère double-fragment complexé à la cocaïne, on peut tracer les graphes présentés Figure 109.

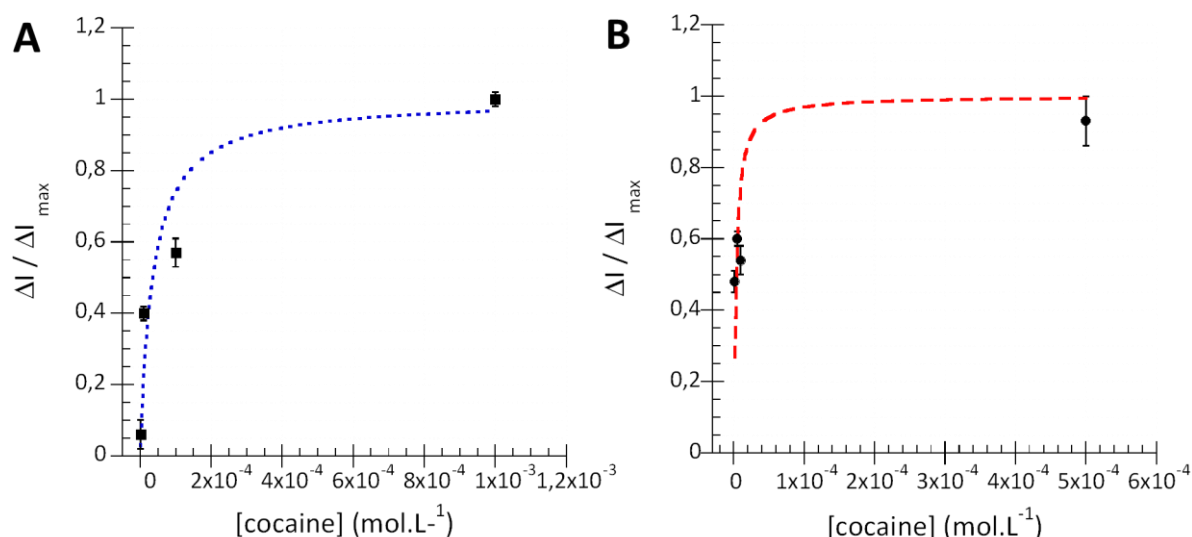


Figure 109. Variation de $\Delta I / \Delta I_{\max}$ en fonction du logarithme de la concentration de cocaïne et les courbes issues de la simulation avec l'équation de Langmuir associées. Les électrodes ont été incubées successivement avec (A). $1 \mu\text{mol.L}^{-1}$ (■, - - -) ou avec (B). $0,1 \mu\text{mol.L}^{-1}$ (●, - - -) d'aptamère double-fragment. Les données expérimentales sont représentées par ● et ■ et les courbes de simulation associées par - - - et - - -. Les barres d'erreurs représentent la déviation standard sur au moins 3 électrodes.

Sur la Figure 109 A et B sont représentées les données expérimentales obtenues avec des concentrations croissantes de cocaïne pour une concentration d'aptamère de $1 \mu\text{mol.L}^{-1}$ et de $0,1 \mu\text{mol.L}^{-1}$ ainsi que les courbes résultant de la simulation par l'équation de Langmuir. Bien que la courbe de simulation établie avec le modèle de Langmuir ne passe pas par tous les points, elle nous a permis d'avoir une estimation des valeurs de constante de dissociation K_d respectivement égales à $3,5 \times 10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$ et à $3,3 \times 10^{-6} \text{ mol.L}^{-1}$. Les résultats sont rassemblés Tableau 17.

b. Traitement des données expérimentales par l'isotherme de Langmuir-Freundlich

Les données expérimentales ont également été analysées par l'isotherme de Langmuir-Freundlich.

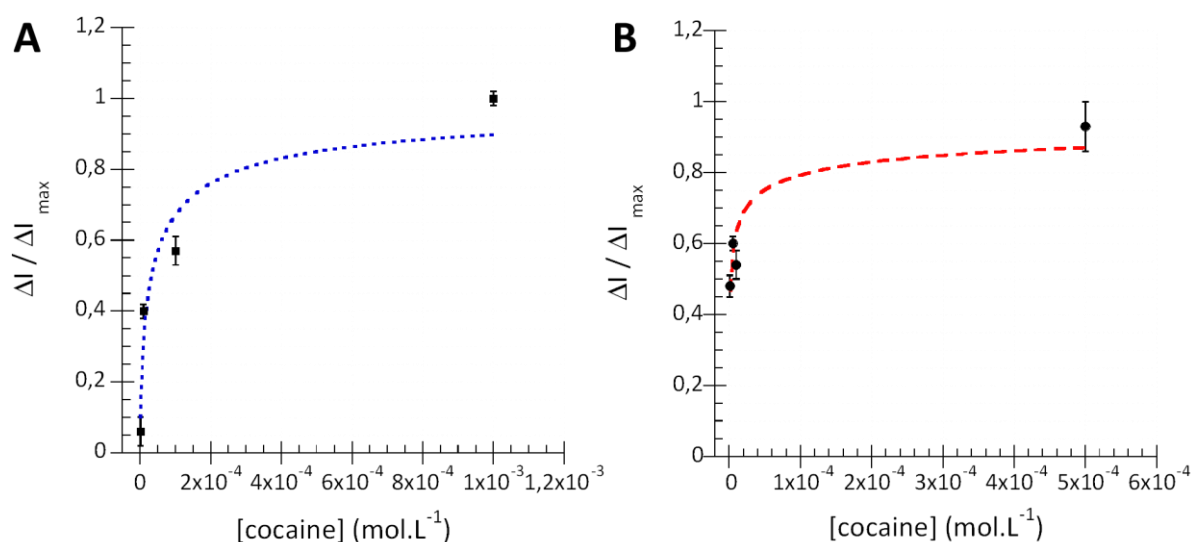


Figure 110. Variation de $\Delta I / \Delta I_{\max}$ en fonction du logarithme de la concentration de cocaïne et les courbes issues de la simulation avec l'équation de Langmuir - Freundlich associées. Les électrodes ont été incubées successivement avec (A). $1 \mu\text{mol.L}^{-1}$ (■, - - -) ou avec (B). $0,1 \mu\text{mol.L}^{-1}$ (●, - - -) d'aptamère double-fragment. Les données expérimentales sont représentées par ● et ■ et les courbes de simulation associées par - - - et - - -. Les barres d'erreurs représentent la déviation standard sur au moins 3 électrodes.

Les Figure 110 A et B montrent la variation de $\Delta I / \Delta I_{\max}$ en fonction de concentration croissantes de cocaïne pour une concentration d'aptamère de $1 \mu\text{mol.L}^{-1}$ et de $0,1 \mu\text{mol.L}^{-1}$ ainsi que les courbes résultant de la simulation par l'équation de Langmuir. Les valeurs des constantes respectives de dissociation sont : $K_d = 1,5 \times 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$ et $K_d = 3,5 \times 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$.

Le Tableau 17 récapitule les valeurs des constantes calculées en utilisant les 2 différents modèles.

Tableau 17. Récapitulatif des constantes déterminées par les isothermes de Langmuir et Langmuir – Freundlich pour la détection de la cocaïne par photoélectrochimie après intercalation de l'aptamère double-fragment sur un film de $\text{poly}[\text{Ru}(\text{bpy-pyrrole})_2(\text{dppn})]^{2+}$.

Modèle	[aptamère]	$K_d (\text{mol.L}^{-1})$	$K_a (\text{L.mol}^{-1})$	n	R^2
Langmuir	$10^{-6} \text{ mol. L}^{-1}$	$3,5 \times 10^{-5}$	$2,9 \times 10^4$	/	0,863
	$10^{-7} \text{ mol. L}^{-1}$	$3,3 \times 10^{-6}$	$3,1 \times 10^5$	/	0,325
Langmuir-Freundlich	$10^{-6} \text{ mol. L}^{-1}$	$1,5 \times 10^{-3}$	$6,7 \times 10^2$	0,6	0,939
	$10^{-7} \text{ mol. L}^{-1}$	$3,5 \times 10^{-4}$	$2,9 \times 10^3$	0,6	0,938

Au vu de ces résultats, le modèle de Langmuir-Freundlich, comme dans le cas du chapitre précédent, est celui qui décrit le mieux les données expérimentales. Une valeur de n de 0,6 décrit une interaction plus homogène que celle décrite dans le cas de l'hybridation d'ADN ($n = 0,2$ ou $0,4$). Ceci peut s'expliquer par le fait que le mécanisme de formation de l'aptamère à la surface de l'électrode fait intervenir moins de bases appariées que dans le cas d'une hybridation de l'ADN du VIH et induit une interaction moins complexe avec les unités $\text{Ru}^{\text{II}}(\text{dppn})$. La modélisation par un modèle de Langmuir-Freundlich donne accès à des K_d apparents de l'ordre de $1500 \mu\text{mol L}^{-1}$ et $350 \mu\text{mol L}^{-1}$ pour des concentrations respectives d'aptamère de 1 et $0,1 \mu\text{mol L}^{-1}$. Ces valeurs de K_d sont plus élevées que le K_d de la cocaïne pour l'aptamère double fragment en solution (de l'ordre de $120,6 \mu\text{mol L}^{-1[51]}$). Ceci est probablement dû à une plus faible interaction de la cocaïne pour les fragments de l'aptamère anti-cocaïne immobilisés à la surface de l'électrode, comparé à des interactions en solution. Comme déjà mentionné, le modèle décrit les différences d'affinité entre une concentration d'aptamère de $1 \mu\text{mol}$ et $0,1 \mu\text{mol L}^{-1}$. La Figure 111 montre le schéma des électrodes modifiées par les différentes concentrations d'aptamère et la cocaïne. Bien qu'une concentration élevée d'aptamère permette d'immobiliser un grand nombre de fragments α , cela induit une baisse notable du photocourant de départ et une contrainte dans la formation du complexe aptamère/cocaïne à la surface (Figure 111A), au contraire de l'utilisation de plus faibles concentrations (Figure 111B).

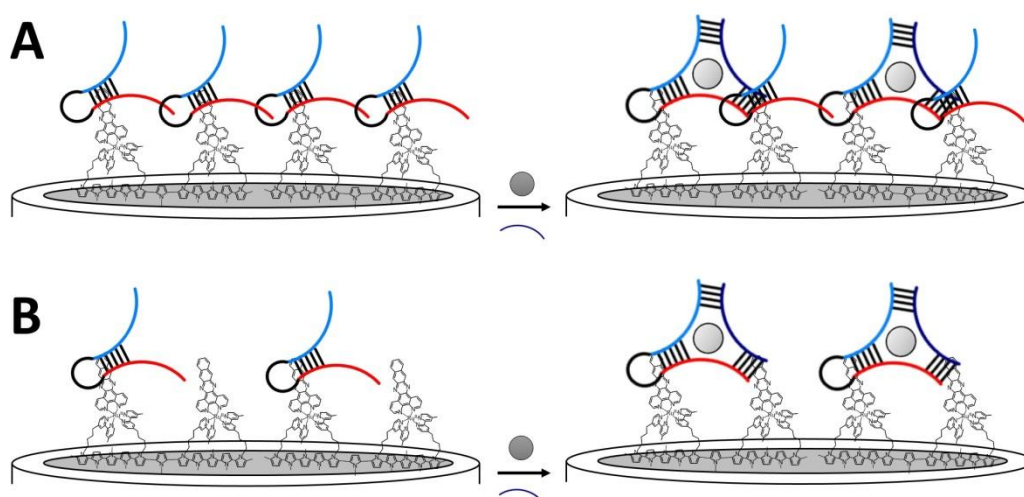


Figure 111. Schéma de la formation du complexe aptamère/cocaïne à la surface de l'électrode de poly- $[\text{Ru}(\text{bpy-pyrrole})_2(\text{dppn})]^{2+}$ dans le cas d'une concentration en aptamère α et β de (A). $1 \mu\text{mol L}^{-1}$ et (B) $0,1 \mu\text{mol L}^{-1}$.

Enfin, l'utilisation d'une échelle logarithmique permet d'obtenir une gamme de détection linéaire de la cocaïne (Figure 112).

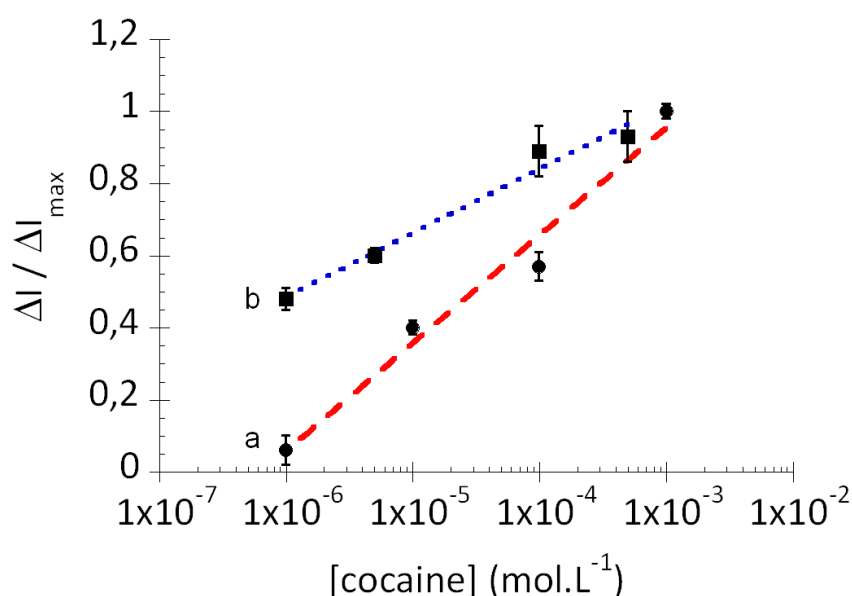


Figure 112. Gammes linéaires des deux systèmes étudiés. La courbe (a) représentée par (●, — — —) a été obtenue avec une concentration d'aptamère α de $1 \mu\text{mol.L}^{-1}$ et la courbe (b) représentée par (■, - - -) a été obtenue avec une concentration d'aptamère α de $0,1 \mu\text{mol.L}^{-1}$.

Bien que cette gamme reste à optimiser au niveau du nombre de points, en particulier aux plus faibles concentrations pour la droite avec une concentration d'aptamère α de $0,1 \mu\text{mol.L}^{-1}$, ces électrodes peuvent être utilisées comme aptacapteur de la cocaïne. La gamme de concentration est comprise entre 10^{-6} et $5 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$. Notons que pour des concentrations en aptamère de $0,1 \mu\text{mol L}^{-1}$, des expériences supplémentaires sont en cours pour vérifier la possibilité d'étendre la gamme en dessous de $10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$. A ce stade des expériences, la limite de détection est de $10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ avec des pentes de 0,30 et 0,18 par unité de log pour des concentrations respectives en aptamère de 1 et $0,1 \mu\text{mol L}^{-1}$.

Si l'on compare notre biocapteur au seul exemple d'aptacapteur photoélectrochimique, basé sur le marquage d'un fragment de l'aptamère par une nanoparticule semi-conductrice de $\text{CdS}^{[10]}$, notre dispositif a la même limite de détection. Cependant, notre aptacapteur est caractérisé par une gamme linéaire en concentration plus importante comprise entre 10^{-6} et $5 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$, contre une gamme linéaire comprise entre 10^{-6} et $10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$.

Des aptacapteurs de la cocaïne basés sur une détection par DPV ont montré des limites de détection submicromolaires, voire nanomolaires, mais des gammes de linéarités peu étendues, allant jusqu' à $10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$. [55,62–65]

6. Conclusion

En conclusion, grâce aux propriétés intercalantes d'un métallopolymère électrogénéré, un dispositif capable d'immobiliser sélectivement la cocaïne a été élaboré. Il permet de proposer un nouveau type d'aptacapteur photoélectrochimique spécifique de la cocaïne. Cette étude a également permis d'étudier la reconnaissance de l'aptamère à la surface d'électrodes photosensibles, de mettre en évidence des différences d'interactions entre un aptamère mono-fragment et double fragment et de trouver les conditions optimales de formation du complexe aptamère/cocaïne à la surface des électrodes. Les performances du biocapteur sont parmi les meilleurs dans le domaine des biocapteurs électrochimiques. De plus, cette approche photoélectrochimique ne nécessite aucun marquage de l'ADN et offre une méthode peu coûteuse et adaptable à des systèmes portables ou à des électrodes « jetables ». Bien sûr, plusieurs paramètres restent à être optimisés tels que sa reproductibilité sur une gamme plus étendue en concentration, son fonctionnement en milieu complexe et sur des échantillons réels.

VI. Conclusions et perspectives

Dans ce chapitre, nous avons décrit la conception d'un biocapteur à ADN basé sur une détection photoélectrochimique. La synthèse, la caractérisation et l'électropolymérisation d'un complexe de ruthénium, de type métallointercalant, offre une grande flexibilité de mise en œuvre de biocapteur à ADN. Les propriétés photoélectrochimiques du métallopolymère électrogénéré, ainsi que ses propriétés intercalantes permettent l'accroche d'ADN hybridé à la surface de l'électrode et la détection de phénomène de reconnaissance, telles que l'hybridation d'ADN ou la reconnaissance aptamère-molécule cible. La sensibilité de cette technique et sa reproductibilité ont permis de modéliser ses interactions par un modèle de type Langmuir-Freundlich et de démontrer la faisabilité d'un biocapteur de l'ADN du VIH et de la cocaïne. Bien que les performances puissent encore être optimisées, l'obtention de gamme linéaire pour la détection de ces cibles d'intérêt permet de valider ce type original de biocapteur photoélectrochimique.

Les perspectives envisageables pour ce type de dispositifs sont les tests en milieu complexe et la conception d'un biocapteur de type signal « on », qui pourrait se faire en développant des systèmes d'immobilisation de complexes binaires d'acide nucléique récemment découverts (aptakiss)^[66]. En modifiant l'aptamère partenaire qui reconnaît la cible, en solution, par une sonde électrochimique ou fluorescente, le signal de détection électrochimique ou optique augmenterait avec la concentration de la cible détectée et génèrerait un signal « on ».

La capacité des monomères de Ru(II) à être électropolymérisés de manière contrôlée sur tout type d'électrodes et microélectrodes, ainsi que la facilité de mise en œuvre de la détection photoélectrochimique (l'irradiation peut facilement provenir de la lumière solaire) rendent leur intégration possible dans des microdispositifs multianalytes à base de réseaux de microélectrodes.

Enfin, les propriétés électrochimiluminescentes bien connues des complexes polypyridiniques de ruthénium(II) nous permettent également d'envisager l'étude d'aptacapteurs à base d'ECL afin d'élargir le domaine d'étude de ces aptacapteurs photoélectrochimiques.

VII. Bibliographie

- [1] E. G. Hvastkovs, D. A. Buttry, *The Analyst* **2010**, 135, 1817.
- [2] S. Cosnier, P. Mailley, *The Analyst* **2008**, 133, 984.
- [3] Y. Du, B. Li, E. Wang, *Acc. Chem. Res.* **2013**, 46, 203–213.
- [4] F. Lucarelli, S. Tombelli, M. Minunni, G. Marrazza, M. Mascini, *Anal. Chim. Acta* **2008**, 609, 139–159.
- [5] T. G. Drummond, M. G. Hill, J. K. Barton, *Nat. Biotechnol.* **2003**, 21, 1192–1199.
- [6] F. Wang, X. Liu, I. Willner, *Adv. Mater.* **2013**, 25, 349–377.
- [7] N. Haddour, J. Chauvin, C. Gondran, S. Cosnier, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, 128, 9693–9698.
- [8] Y. Wenjuan, A. Le Goff, N. Spinelli, M. Holzinger, G.-W. Diao, D. Shan, E. Defrancq, S. Cosnier, *Biosens. Bioelectron.* **2013**, 42, 556–562.
- [9] M. Hua, P. Li, L. Li, L. Huang, X. Zhao, Y. Feng, Y. Yang, *J. Electroanal. Chem.* **2011**, 662, 306–311.
- [10] E. Golub, G. Pelossof, R. Freeman, H. Zhang, I. Willner, *Anal. Chem.* **2009**, 81, 9291–9298.
- [11] W. Lu, G. Wang, Y. Jin, X. Yao, J. Hu, J. Li, *Appl. Phys. Lett.* **2006**, 89, 263902.
- [12] W.-W. Zhao, P.-P. Yu, Y. Shan, J. Wang, J.-J. Xu, H.-Y. Chen, *Anal. Chem.* **2012**, 84, 5892–5897.
- [13] Y. Zhou, Z. Xu, M. Wang, B. Sun, H. Yin, S. Ai, *Biosens. Bioelectron.* **2014**, 53, 263–267.
- [14] W.-W. Zhao, J.-J. Xu, H.-Y. Chen, *Chem. Rev.* **2014**, 114, 7421–7441.
- [15] U. Schatzschneider, J. Niesel, I. Ott, R. Gust, H. Alborzinia, S. Wölfl, *ChemMedChem* **2008**, 3, 1104–1109.
- [16] A. E. Friedman, J. C. Chambron, J. P. Sauvage, N. J. Turro, J. K. Barton, *J. Am. Chem. Soc.* **1990**, 112, 4960–4962.
- [17] R. M. Hartshorn, J. K. Barton, *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, 114, 5919–5925.
- [18] C. Moucheron, A. Kirsch-De Mesmaeker, J. M. Kelly, *J. Photochem. Photobiol. B* **1997**, 40, 91–106.
- [19] R. E. Holmlin, E. D. A. Stemp, J. K. Barton, *Inorg. Chem.* **1998**, 37, 29–34.
- [20] C. Hiort, P. Lincoln, B. Norden, *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, 115, 3448–3454.
- [21] E. Tuite, P. Lincoln, B. Nordén, *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, 119, 239–240.
- [22] Y. Sun, L. E. Joyce, N. M. Dickson, C. Turro, *Chem. Commun.* **2010**, 46, 2426–2428.
- [23] S. P. Foxon, M. A. H. Alamiry, M. G. Walker, A. J. H. M. Meijer, I. V. Sazanovich, J. A. Weinstein, J. A. Thomas, *J. Phys. Chem. A* **2009**, 113, 12754–12762.
- [24] S. P. Foxon, C. Metcalfe, H. Adams, M. Webb, J. A. Thomas, *Inorg. Chem.* **2007**, 46, 409–416.
- [25] L.-N. Ji, J.-G. Liu, B.-H. Ye, *Mater. Sci. Eng. C* **1999**, 10, 51–57.
- [26] M. R. Gill, J. A. Thomas, *Chem. Soc. Rev.* **2012**, 41, 3179–3192.
- [27] B. M. Zeglis, V. C. Pierre, J. K. Barton, *Chem. Commun.* **2007**, 4565.
- [28] J. Wang, *Anal. Chim. Acta* **2002**, 469, 63–71.
- [29] C. Li, H. Wang, J. Shen, B. Tang, *Anal. Chem.* **2015**, 87, 4283–4291.
- [30] W.-W. Zhao, J.-J. Xu, H.-Y. Chen, *Chem Soc Rev* **2015**, 44, 729–741.
- [31] W. E. Jones, M. A. Fox, *J. Phys. Chem.* **1994**, 98, 5095–5099.
- [32] A. Le Goff, S. Cosnier, *J. Mater. Chem.* **2011**, 21, 3910–3915.
- [33] A. Le Goff, M. Holzinger, S. Cosnier, *Electrochimica Acta* **2011**, 3633–3640.

- [34] N. Haddour, Réalisation D'assemblages Biologiques électroactifs : Application Aux Biocapteurs D'affinité, Grenoble 1, **2005**.
- [35] H. D. Abruna, T. J. Meyer, R. W. Murray, *Inorg. Chem.* **1979**, *18*, 3233–3240.
- [36] A. Perrin, D. Duracher, M. Perret, P. Cleuziat, B. Mandrand, *Anal. Biochem.* **2003**, *322*, 148–155.
- [37] A. Bouchet, C. Chaix, C. A. Marquette, L. J. Blum, B. Mandrand, *Biosens. Bioelectron.* **2007**, *23*, 735–740.
- [38] J. Baur, C. Gondran, M. Holzinger, E. Defrancq, H. Perrot, S. Cosnier, *Anal. Chem.* **2010**, *82*, 1066–1072.
- [39] S. Liu, C. Li, J. Cheng, Y. Zhou, *Anal. Chem.* **2006**, *78*, 4722–4726.
- [40] “interchim,” can be found under <http://www.interchim.fr/ft/7/77776A.pdf>, **n.d.**
- [41] N. C. Tansil, E. A. B. Kantchev, Z. Gao, H. Yu, *Chem. Commun.* **2011**, *47*, 1533.
- [42] S. Sharma, G. P. Agarwal, *Anal. Biochem.* **2001**, *288*, 126–140.
- [43] E. L. S. Wong, J. J. Gooding, *Anal. Chem.* **2006**, *78*, 2138–2144.
- [44] S. Neugebauer, A. Zimdars, P. Liepold, M. Gębala, W. Schuhmann, G. Hartwich, *ChemBioChem* **2009**, *10*, 1193–1199.
- [45] F. Patolsky, A. Lichtenstein, I. Willner, *Nat. Biotechnol.* **2001**, *19*, 253–257.
- [46] H. Chang, Y. Yuan, N. Shi, Y. Guan, *Anal. Chem.* **2007**, *79*, 5111–5115.
- [47] T. Selvaraju, J. Das, K. Jo, K. Kwon, C.-H. Huh, T. K. Kim, H. Yang, *Langmuir* **2008**, *24*, 9883–9888.
- [48] S. Pinijsuwan, P. Rijiravanich, M. Somasundrum, W. Surareungchai, *Anal. Chem.* **2008**, *80*, 6779–6784.
- [49] G. Liu, Y. Wan, V. Gau, J. Zhang, L. Wang, S. Song, C. Fan, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 6820–6825.
- [50] OFDT, can be found under <http://www.ofdt.fr/publications/collections/rapports/ouvrages-collectifs/cocaine-donnees-essentielles/>, **n.d.**
- [51] H. Xu, K. Gorgy, C. Gondran, A. Le Goff, N. Spinelli, C. Lopez, E. Defrancq, S. Cosnier, *Biosens. Bioelectron.* **2013**, *41*, 90–95.
- [52] J. Tang, J. Xie, N. Shao, Y. Yan, *ELECTROPHORESIS* **2006**, *27*, 1303–1311.
- [53] A. Mokhtarzadeh, J. Ezzati Nazhad Dolatabadi, K. Abnous, M. de la Guardia, M. Ramezani, *Biosens. Bioelectron.* **2015**, *68*, 95–106.
- [54] D.-W. Zhang, F.-T. Zhang, Y.-R. Cui, Q.-P. Deng, S. Krause, Y.-L. Zhou, X.-X. Zhang, *Talanta* **2012**, *92*, 65–71.
- [55] D.-W. Zhang, C.-J. Sun, F.-T. Zhang, L. Xu, Y.-L. Zhou, X.-X. Zhang, *Biosens. Bioelectron.* **2012**, *31*, 363–368.
- [56] Q. Cai, L. Chen, F. Luo, B. Qiu, Z. Lin, G. Chen, *Anal. Bioanal. Chem.* **2011**, *400*, 289–294.
- [57] R. Zou, X. Lou, H. Ou, Y. Zhang, W. Wang, M. Yuan, M. Guan, Z. Luo, Y. Liu, *RSC Adv.* **2012**, *2*, 4636.
- [58] Y. Zhao, X.-W. He, X.-B. Yin, *Chem. Commun.* **2011**, *47*, 6419.
- [59] O. P. Edupuganti, Y. Singh, E. Defrancq, P. Dumy, *Chem. – Eur. J.* **2004**, *10*, 5988–5995.
- [60] M. N. Stojanovic, P. de Prada, D. W. Landry, *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 4928–4931.
- [61] M. N. Stojanovic, D. W. Landry, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 9678–9679.
- [62] J.-L. He, Y.-F. Yang, G.-L. Shen, R.-Q. Yu, *Biosens. Bioelectron.* **2011**, *26*, 4222–4226.
- [63] M. Hua, M. Tao, P. Wang, Y. Zhang, Z. Wu, Y. Chang, Y. Yang, *Anal. Sci.* **2010**, *26*, 1265–1270.

- [64] Y. Du, C. Chen, J. Yin, B. Li, M. Zhou, S. Dong, E. Wang, *Anal. Chem.* **2010**, 82, 1556–1563.
- [65] B. Jiang, M. Wang, Y. Chen, J. Xie, Y. Xiang, *Biosens. Bioelectron.* **2012**, 32, 305–308.
- [66] E. Goux, S. Lisi, C. Ravelet, G. Durand, E. Fiore, E. Dausse, J.-J. Toulmé, E. Peyrin, *Anal. Bioanal. Chem.* **2015**, 407, 6515–6524.
- [67] N. Haddour, J. Chauvin, C. Gondran, S. Cosnier, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, 128, 9693–9698.

VIII. Experimental part

Chemical

All reagents and chemicals were purchased from Aldrich. The phosphate buffer saline (PBS: phosphate 10^{-2} mol.L⁻¹, KCl 2.7×10^{-3} mol.L⁻¹ and NaCl 0.137 mol.L⁻¹ at pH 7.4) purchased from Sigma-Aldrich (France) is prepared with 200 mL of deionized water buffer. Acetonitrile was purchased from Rathburn (HPLC grade). Reagents and chemicals were used as received until it was mentioned. 4-methyl-4'-butylpyrrole-2,2'-bipyridine, [Ru^{II}(4-methyl-4'-butylpyrrole-2,2'-bipyridine)Cl₂], [Ru^{II}(bpy)₂(4,4'-bisbutylpyrrole-2,2' bipyridine)](PF₆) were synthesized according to previously described procedures.^[67]

Cleaning electrodes

The platinum electrodes are cleaned with 2 μ m diamond paste purchased from Presi (France). Then the electrodes are washed with water, ethanol and acetone successively during 5 minutes in the sonicator.

Apparatus

Electrochemical measurements

- Organic media

The electrochemical experiments performed in anhydrous CH₃CN were carried out in a three-electrode electrochemical cell under dry argon atmosphere and in a glove box ([O₂] < 20 ppm). A Pt wire placed in a separated compartment was used as counter electrode, the Ag/AgNO₃ (0.01 mol.L⁻¹ in TBAP 0.1 mol.L⁻¹/CH₃CN) electrode served as reference and a platinum electrode (diameter 5 mm) as a working electrode.

- Aqueous media

The photoelectrochemical experiments were performed under dry argon atmosphere in aqueous buffer. A silver chloride electrode saturated with KCl in aqueous solutions was used as reference electrode (Ag/Ag⁺), a platinum wire served as counter and a platinum electrode (diameter 5 mm) as a working electrode.

All potentials given in this work are referred to a (Ag/AgNO₃) reference electrode in acetonitrile and a silver chloride electrode saturated with KCl in aqueous solutions. All the electrochemical measurement was performed using NOVA software (v.1.11.1) with a Autolab PGSTAT 100 potenstioestat (Metrohm).

NMR

NMR spectra were recorded on a Bruker Avance 400 operating at 400.0 MHz for ¹H and with proton decoupling for ¹³C. ESI mass spectra were recorded with a Bruker APEX-Qe ESI FT-ICR mass spectrometer.

UV-Visible spectra

UV-visible spectra were recorded on a Cary 300 or with a Perkin Elmer Lambda 650 spectrophotometer with a quartz cuvette (1 cm depth).

Fluorescence

Fluorescence microscopic images were recorded with an OLYMPUS BX61 microscope (exciter: HQ545/30, emitter: HQ610/75, beamsplitter: 400dclp; Japan). The (Streptavidin-RPE) was purchased from Interchim. Experiments were performed on gold microelectrode array wafers provided by the Biosensors and Biocatalysis Group of the University of Leeds (U.K.).

Synthesis of bis (4-methyl-4'-butylpyrrole-2,2'-bipyridine) (dppn) ruthenium

A solution of [Ru^{II}(4-methyl-4'-butylpyrrole-2,2'-bipyridine)Cl₂] complex (30 mg, 0.04 mmol) and dppn (15 mg, 0.045 mmol in ethylene glycol (2.5 mL) was refluxed for 1h. The mixture was allowed to cool down to room temperature and a saturated NH₄PF₆ aqueous solution (6 mL) was added allowing the formed product to precipitate. The precipitate was filtered and washed successively with H₂O (20 mL), EtOH (20 mL) and then dried with Et₂O to obtained 38 mg (73 %) of product as reddish orange powder.

¹H NMR δ_H (ppm) (400 MHz, CD₃CN): 1.58 (q, 4H, J=6.2Hz), 1.71 (q, 4H, J=7Hz), 2.49 (s, 3H), 2.58 (s, 3H), 2.73 (t, 2H, J=7.4), 2.82 (t, 2H, J=7.8Hz), 3.86 (t, 2H, J=6.8Hz), 3.94 (t, 2H,

J=6.6Hz), 5.96 (s, 2H), 6.03 (s, 2H), 6.59 (s, 2H), 6.67 (s, 2H), 7.05-7.11 (m, 2H), 7.24-7.29 (m, 2H), 7.56 (d, 2H, J=5.6Hz), 7.62-7.64 (m, 2H), 7.76-7.78 (m, 2H), 7.84-7.88 (m, 2H), 8.12-8.13 (m, 2H), 8.28-8.32 (m, 2H), 8.36-8.39 (m, 4H), 9.14 (s, 2H), 9.63 (d, 2H, J=8Hz) ;

MS (ESI⁺): 508.4 (M-2PF₆²⁺)

UV/Vis in CH₃CN: λ_{max} / 443 nm; ϵ = 23 593.8 L mol⁻¹ cm⁻¹

Synthesis of [Ru(bpy-pyrrole)₂(bpy)]²⁺

A solution of [Ru^{II}(4-methyl-4'-butylpyrrole-2,2'-bipyridine)Cl₂] complex (50 mg, 103 μ mol) and bpy-(pyrrole)₂ (41 mg, 103 μ mol) in ethylene glycol (3 mL) was refluxed for 30 minutes under argon. The mixture was allowed to cool down to room temperature and a saturated NH₄PF₆ aqueous solution (6 mL) was added allowing the formed product to precipitate. The precipitate was filtered and washed successively with H₂O (20 mL), EtOH (20 mL) and then dried with Et₂O to obtained 110 mg (97 %) of product as reddish orange powder.

Electrochemical and photoelectrochemical experiments

Electropolymerization of a solution of 0.5×10^{-3} mol.L⁻¹ ([Ru(bpy-pyrrole)₂(dppn)]²⁺) was performed using cyclic voltammetry with 20 scans at 100 mV.s⁻¹ between 0 and 0.75 V vs. Ag/AgNO₃. The characterization was performed using cyclic voltammetry at 100 mV.s⁻¹ between -2.20 V and +1.30 V vs. Ag/AgNO₃. The resulting modified electrodes were then rinsed with acetonitrile.

Polymerization yields were calculated from potentiostatic electrodeposition experiments by dividing the charge recorded under the one electron oxidation wave of polymerized Ru(II) complex by the charge passed during the controlled potential electrolysis (1 mC) at 0.75 V and multiplying by 5.66 (2.33 electrons per pyrrole group plus 1 electron for the oxidation of Ru(II) into Ru(III)).

To monitor the photogenerated current, the modified electrodes were potentiostated at 0 V vs. Ag/Ag⁺ in deaerated PBS pH 7.4 containing 10⁻² mol.L⁻¹ of sodium ascorbate or in acetate buffer 0.1 mol.L⁻¹ pH 5 containing 15 mmol.L⁻¹ of pentaaminechlorocobalt (III) chloride ([Co(III)(NH₃)₅ Cl]²⁺Cl₂). An electrochemical cell with a quartz window was used instead of a classic electrochemical cell. The working electrode was placed in front of the quartz window

and irradiated with a 200 W Hg lamp using UV and IR cut-off filters below 420 nm and 630 nm with a surface light intensity of $8.5 \mu\text{W}\cdot\text{cm}^{-2}$.

Oligonucleotides

HIV DNA

The different HIV oligonucleotides sequences were prepared by automated DNA synthesis on an ABI 3400 DNA synthesizer (Applied Biosystem) by use of standard β -cyanoethylphosphoramidite chemistry on a $1 \mu\text{mol}$ scale.

Probe ^[37]: 5'- GAG ACC ATC AAT GAG GAA GCT G - 3',

Target ^[37]: 5'- ATC CCA TTC TGC AGC TTC CTC ATT GAT GGT CTC -3',

Biotinylated target ^[38]: 5'- biotin-ATC CCA TTC TGC AGC TTC CTC ATT GAT GGT CTC - 3',

Non complementary target: 5'- GAC TAT TCG CTT CCT ACG ACT CCT ATT CTC GGT - 3'.

The hybridization between the HIV DNA probe and target was performed by increasing the temperature to 90°C for 1 min and then cooling slowly (for 2 hours) to room temperature in phosphate buffer saline. 40 μL of HIV DNA solution was spread on the Pt / poly-[Ru(bpy-pyrrole)₂dppn]²⁺ electrode surface during 30 minutes. The resulting electrodes were washed firstly during 15 min with PBS containing 0.1 % SDS and then with PBS. The same protocol was applied for HIV DNA probe and scramble.

Cocaine aptamer

Two types of cocaine aptamer were synthesized. The first one was synthesized as previously ^[58] (5' - GGG AGA CAA GGA AAA TCC TTC AAT GAA GTG GGT CGA CA - 3'). The second one was synthesized as previously ^[57] and is composed by two sequences : 5' – GTT CTT CAA TGA AGT GTG GGA CGA CA - 3'(aptamer α) and 5' – GGG AGT CAA GAA C - 3' (aptamer β).

Briefly, these aptamers were prepared by automated DNA synthesis on an ABI 3400 DNA synthesizer (Applied Biosystem) by the use of β -cyanoethylphosphoramidite chemistry on a 3400DNA synthesizer at $1 \mu\text{mol}$ scale. RP-HPLC analysis were performed on a HPLC system using C18 Nucleosil column (Macherey-Nagel, 250 x 4.6mm, 100Å, 5 μm) with 1mL/min flow linear gradients of solvent A (50mM triethylammonium acetate buffer with 5 % acetonitrile)

and solvent B (acetonitrile with 5% water) with UV-monitoring at 260nm and 280nm. After the oligonucleotide is cleaved from the support, HPLC purification can separate the full length product from the truncated sequences. Left the product obtained after HPLC purification for drying. The supernatant was transferred to the bulb and 300 μ L of AcOH (80%) was added to remove DMT groups. DMTOH was removed by ether extraction and oligonucleotide was quantified by UV and analyzed by HPLC and mass spectrometry

Cocaine

The cocaine and the cocaine aptamer were prepared in tris-HCl 0.2 mol.L⁻¹ pH 7,4 buffer (20 mmol.L⁻¹ Tris-HCl pH 7.4, 140 mmol.L⁻¹ NaCl and 2 mmol.L⁻¹ MgCl₂). The photocurrent experiments with cocaine were performed in the same buffer.

Conclusion générale

Ce travail de recherche portait sur l'élaboration de deux types de biocapteurs. Le premier biocapteur à base de poly-(pyrrole-NTA) pour la détection d'ADN portant une 8-oxo-guanine et le second biocapteur à base de poly-[Ru(bpy-pyrrole)₂dppn]²⁺ pour la détection d'ADN du VIH et de cocaïne.

Dans le premier chapitre de ce manuscrit, la notion de biocapteur a été définie et les biocapteurs à ADN à base de polymères électrogénérés présentés.

Dans le second chapitre, la détection de duplex d'ADN sans lésions et d'ADN portant des lésions de type 8-oxo-guanine a été étudié par spectroscopie d'impédance électrochimique, suite à l'immobilisation de la protéine Formamidopyrimidine ADN Glycosylase (Fpg) de *Deinococcus radiodurans*.

L'immobilisation de la protéine se fait *via* une électrode fonctionnalisée par un polypyrrole électrogénéré et un système d'affinité NTA / Cu²⁺ / Histidine. Cette immobilisation a été caractérisée par spectroscopie d'impédance électrochimique et par résonance de plasmons de surface. Nous disposons de deux protéines Fpg pour cette étude, différant uniquement par la place de l'étiquette tag histidine. Dans un premier temps, nous avons étudié l'immobilisation d'un duplex d'ADN non-lésé sur ces bioélectrodes. Ainsi, nous avons optimisé les paramètres du biocapteur et étudié l'influence de la position du tag histidine au niveau des deux protéines sur les mesures d'impédance électrochimique. Dans une seconde partie, la reconnaissance de l'ADN double-brin a été détectée par chrono-impédancéométrie. Des tests préliminaires avec des ADN lésés montrent un comportement différent à la surface des bioélectrodes. La poursuite de ces études, en particulier, en couplant la SPR à la spectroscopie d'impédance électrochimique, est en cours pour comprendre les mécanismes impliqués à la surface de la bioélectrode.

Dans le troisième chapitre, un biocapteur à ADN à base d'un complexe de ruthénium original a été élaboré. Ce complexe est basé sur un complexe de ruthénium polypyridinique possédant des propriétés photoélectrochimiques, des groupements pyrrole électropolymérisables et un ligand dppn (benzo[i]dipyrido-[3,2-a:2'.3'-c]phenazine). Dans un premier temps, la synthèse, la présentation des propriétés de ce complexe ainsi que sa

caractérisation électrochimique ont été décrites. Ensuite, ce travail s'est penché sur la détection de l'ADN du VIH. Le but a été de montrer qu'il était possible d'élaborer un biocapteur en immobilisant les duplex d'ADN par intercalation dans le ligand dppn présent sur les électrodes modifiées par le poly-[Ru(bpy-pyrrole)₂(dpnn)]²⁺. Pour cela, deux stratégies ont testées pour l'obtention d'une courbe d'étalonnage. La première stratégie consistait à garder la concentration d'ADN sonde constante ($6,40 \times 10^{-10} \text{ mol.L}^{-1}$) et à faire varier la concentration d'ADN cible. Ainsi une limite de détection de $8 \times 10^{-15} \text{ mol.L}^{-1}$ et une sensibilité de 0,06 unités de $\Delta I/\Delta I_{\text{max}}$ par décade avec une gamme de linéarité allant de 4×10^{-14} à $5 \times 10^{-12} \text{ mol.L}^{-1}$ est obtenue. Dans le cas de la seconde stratégie où la concentration d'ADN sonde était égale à la concentration d'ADN cible et où le rinçage après incubation était réalisée dans une solution tampon contenant 0,1% de SDS, une faible limite de détection ($10^{-15} \text{ mol.L}^{-1}$) avec une sensibilité de 0,01 unité de $\Delta I/\Delta I_{\text{max}}$ par décade ($R^2 = 0,981$) avec une gamme de linéarité de allant de 10^{-15} à $3,1 \times 10^{-10} \text{ mol.L}^{-1}$ a été obtenue.

La seconde partie de ce travail a constitué à élaborer un aptacapteur photoélectrochimique à cocaïne basé sur l'interaction des électrodes modifiés par le poly-[Ru(bpy-pyrrole)₂(dpnn)]²⁺ avec une partie de l'aptamère. Pour cela, deux types d'aptamère anti-cocaïne ont été utilisés : l'aptamère mono-fragment et l'aptamère double-fragments. L'utilisation de l'aptamère mono-fragment pour l'élaboration de l'aptacapteur n'a pas été concluante. Concernant l'aptamère double-fragment, deux courbes d'étalonnage ont été obtenues. La différence entre ces deux courbes est la concentration d'aptamère utilisée pour la détection de la cocaïne qui était soit de $10^{-06} \text{ mol.L}^{-1}$ soit de $0,1 \times 10^{-06} \text{ mol.L}^{-1}$. Ainsi une limite de détection de $10^{-06} \text{ mol.L}^{-1}$ a été obtenue pour les deux concentrations d'aptamères testées. Ces courbes de calibration restent néanmoins à optimiser afin d'améliorer les performances de cet aptacapteur. Il serait intéressant par la suite de tester ces dispositifs en milieu complexe. De plus, afin de ne pas être limitée, la conception d'un biocapteur de type « signal on » pourrait être envisagé. Enfin, les propriétés électrochimiluminescentes des complexes polypyridiniques de ruthénium(II) nous permettent également d'envisager l'étude d'aptacapteurs à base d'ECL afin d'élargir le domaine d'étude de ces aptacapteurs photoélectrochimiques.

En résumé, cette thèse a fait intervenir la conception de biocapteurs basés sur une détection par spectroscopie d'impédance électrochimique et par photoélectrochimie. Ces deux

techniques ont une sensibilité suffisante pour pouvoir détecter les phénomènes de reconnaissance impliquant l'ADN et l'immobilisation de l'espèce cible à la surface de l'électrode, de pouvoir étudier la nature des interactions et de concevoir des capteurs d'oligonucléotides, de lésions ou de petite molécule comme la cocaïne. Nous avons ainsi pu étudiée à la surface de nos bioélectrodes, trois types d'interactions : hybridation, ADN/protéine de réparation et aptamère/molécule. Cette étude souligne la richesse des biocapteurs basés sur les oligonucléotides, que ce soit des interactions naturelles ou artificielles. En profitant de cette diversité, ce travail a ouvert la voie au développement de nouveaux biocapteurs électrochimiques qui continueront à profiter des avancées dans le domaine des polymères électrogénérées, des matériaux d'électrodes et de la biochimie de l'ADN.

CONCEPTION DE BIOCAPTEURS À ADN PHOTOÉLECTROCHIMIQUES ET IMPÉDANCEMÉTRIQUES À BASE DE POLYMÈRES ÉLECTROGÉNÉRÉS

Cette thèse porte sur la modification d'électrodes par des polymères électrogénérés, capables d'immobiliser une biomolécule et/ou de fournir des propriétés de transduction électrochimique afin d'élaborer des biocapteurs à ADN faisant intervenir différents types d'interactions : ADN/protéine de réparation, hybridation et aptamère/molécule cible.

Dans un premier temps, nous avons immobilisé la protéine Formamidopyrimidine ADN Glycosylase (Fpg) de *D. radiodurans* portant un tag histidine sur un film de poly-(pyrrole-NTA) *via* l'interaction NTA/Cu²⁺/Histidine. Dans le but d'étudier, par spectroscopie d'impédance électrochimique et SPR, l'interaction de cette protéine avec un duplex d'ADN sans lésions et un duplex d'ADN portant une lésion - oxo-guanine (8-oxo-G), car la Fpg est une protéine impliquée dans la réparation de l'ADN lorsque celui-ci comporte un site 8 (8-oxo-G).

Dans un second temps, nous avons élaboré un biocapteur photoélectrochimique à partir d'un complexe multifonctionnel, (Ru(bpy-pyrrole)₂(dppn)]²⁺) (bpy-pyrrole=4-méthyl-4'-butylpyrrole-2,2'-bipyridine, dppn=benzo[i]dipyrido-[3,2-a:2'.3'-c]phénazine) pouvant être électropolymérisé, intercalé l'ADN et photoactivé. La preuve de concept a été réalisée pour une séquence type d'ADN du VIH. Une limite de détection de 10⁻¹⁵ mol.L⁻¹ et une sensibilité de 0,01 unité par décade avec une gamme de linéarité allant de 10⁻¹⁵ à 10⁻¹⁰ mol.L⁻¹ ont été obtenue. Puis, nous avons conçu un aptacapteur pour la détection de la cocaïne à l'aide d'un aptamère double-fragment, formant une seule entité en présence de cocaïne, pouvant être immobilisée par intercalation sur le ligand dppn du métallopolymer. Ainsi une gamme de linéarité comprise entre 10⁻⁶ et 5x10⁻⁴ mol L⁻¹ a été obtenue pour une concentration d'aptamère de 10⁻⁷ mol L⁻¹, avec une limite de détection de l'ordre de 10⁻⁶ mol L⁻¹.

Mots-clés : biocapteur, aptacapteur, ADN, cocaïne, Fpg, photoélectrochimie, spectroscopie d'impédance électrochimique

PHOTOELECTROCHEMICAL AND IMPEDANCEMETRIC DNA BIOSENSORS BASED ON ELECTROGENERATED POLYMERS

This work focuses on the conception and optimization of impedancemetric and photoelectrochemical DNA biosensors based on the modification of electrodes with electrogenerated polymers. Different types of interactions involving DNA were studied: DNA/DNA repair protein, hybridization and aptamer/target molecule.

In the first part, a poly-(pyrrole-NTA)-modified electrode was used to immobilize a protein involved in DNA repair: the Fpg (Formamidopyrimidine DNA Glycosylase) from *D. radiodurans*. This protein was previously tagged with histidine to be immobilized *via* a (NTA)Cu-histidine interaction. This protein detects and removes 8-oxo-guanine (8-oxo-G), a DNA damage caused by irradiation in double stranded DNA. We studied the behavior of this Fpg with DNA duplexes with and without 8-oxo-G nucleotide by electrochemical impedance spectroscopy and SPR.

In the second part, we report the design of novel photoelectrochemical biosensor based on a multifunctional complex, (Ru(bpy-pyrrole)₂(dppn)]²⁺) (bpy-pyrrole=4-methyl-4'-butylpyrrole-2,2'-bipyridine, dppn= benzo[i]dipyrido-[3,2-a:2'.3'-c]phenazine) exhibiting photo-sensitive, DNA-intercalating and electro-polymerizable properties. This modified electrode achieves photoelectrochemical detection on planar electrode by intercalating HIV-DNA duplexes or aptamer-cocaine complexes. The photocurrent generated through visible irradiation was correlated to the oligonucleotides concentration. Low detection limits of 10⁻¹⁵ mol L⁻¹ and sensitivity of 0.01 unit per decade were measured, demonstrating excellent adequacy of these modified electrodes towards duplex HIV DNA detection. For the cocaine detection, the photoelectrochemical aptasensor was based on the immobilization of a 10⁻⁷ mol L⁻¹ double-fragment anti-cocaine aptamer and finally exhibited a linear range between 10⁻⁶ and 5x10⁻⁴ mol L⁻¹ and a detection limit of 10⁻⁶ mol L⁻¹.

Keywords: biosensor, aptasensor, DNA, cocaine, Fpg, photoelectrochemistry, electrochemical impedance spectroscopy